



**Adérito Batista Capelo A FE65 é uma proteína predominante no
interactoma da APP**



Adérito Batista Capelo A FE65 é uma proteína predominante no interactoma da APP

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Odete Abreu Beirão da Cruz e Silva, Professora Auxiliar na Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho a todos aqueles que directa ou indirectamente são responsáveis pelo meu percurso académico.

o júri

presidente

Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
professor associado da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Odete Abreu Beirão da Cruz e Silva
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Sandra Maria Tavares da Costa Rebelo
professora auxiliar convidada da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Os meus agradecimentos vão para todos aqueles que directa ou indirectamente estiveram envolvidos na realização desta dissertação, uma vez que sem eles tal não teria sido possível.

Agradeço em primeiro lugar á Prof.^a Odete, pela orientação durante o desenvolvimento de todo o projecto e por toda a sua dedicação. Agradeço á Sara Domingues pelo tempo e dedicação que me disponibilizou, que apesar de estar grávida, me ensinou várias técnicas necessárias para a prática laboratorial e me dispensou tempo para a parte escrita. Agradeço a todas as pessoas presentes no CBC que de alguma forma me ajudaram, e me proporcionaram um bom ambiente de trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos mais presentes, Fidalgo, Jorge, Vera, Ferrão, Paços, Susana, Daniel, Diogo, entre outros, por estarem comigo quando precisei. Agradeço também a todos os outros pelos momentos de folia, descompressão e actividades extra que me proporcionaram e ajudaram ao meu crescimento pessoal.

Por último, mas não de menor importância, agradeço à minha família, que me apoiou incondicionalmente durante todos estes anos.

"The brain is wider than the sky"
Emily Dickinson

palavras-chave

AICD, Dois-híbrido em levedura, FE65

resumo

A proteína precursora de amiloide de Alzheimer (APP), que está no centro da doença de Alzheimer, pode sofrer várias alterações. A acumulação do péptido β -amiloide, que é um dos fragmentos resultantes da clivagem β , é considerado a causa da doença de Alzheimer. No entanto outros fragmentos, nomeadamente o domínio intracelular (AICD), ainda não têm um papel totalmente esclarecido sobre o modo como participam na doença. Com o objectivo de saber mais sobre as proteínas do cérebro humano saudável com que o AICD interage utilizou-se o método de Dois-híbrido em levedura. Após se terem eliminado os falsos positivos, foram isolados os clones e analisados. Com a utilização de ferramentas bioinformáticas observou-se a interacção entre o AICD e uma proteína já previamente descrita, a FE65, confirmando que o método Dois-híbrido em levedura é viável para detectar interacções entre proteínas. No entanto não se observou outras interacções, realçando a importância desta interacção para a doença. A FE65 não interage com o AICD quando este está fosforilado em alguns aminoácidos chave, sendo esta modificação importante para a interacção. Os níveis de expressão da forma neuronal da FE65 em casos da doença de Alzheimer diminuem, havendo também um aumento do nível de outras proteínas que interagem com o AICD indicando assim uma alteração na interacção entre a FE65 e o AICD.

keywords

APP, Yeast Two-hybrid, FE65.

abstract

The amyloid precursor protein, which is in the center of Alzheimer's disease, can go through several modifications. Alzheimer's disease can be triggered by the accumulation of β -amyloid, an amyloid derivate. Other fragments like the intracellular domain (AICD) could be involved in this disease, however the function and mechanism of AICD is not completely understood. With the aim of knowing the human brain proteins which interact with AICD the yeast two-hybrid method was used. After the false positives elimination, the clones were isolated and analysed. Using bio-informatics tools it was found that the wild type AICD strongly interacts with a protein previously described, the FE65. This shows that the yeast two-hybrid method is viable to detect protein interactions. Others interactions were not detected, enhancing the importance of AICD and FE65 interaction in Alzheimer's disease. When AICD is phosphorylated in some key-aminoacids the interaction with FE65 does not take place, so this modification is crucial in the interaction mechanism. In Alzheimer's patients is verified that FE65 expression levels decrease while the levels of others proteins which interact with AICD increase. This fact shows a change in the interaction between AICD and FE65.

Índice

1	Introdução	1
1.1	A doença de Alzheimer	3
1.2	A Proteína Precursora de Amilóide de Alzheimer (APP) ...	5
1.2.1	Funções da APP	6
1.3	Processamento da APP	7
1.3.1	Clivagem pela α -secretase	8
1.3.2	Clivagem pela β -secretase	9
1.3.3	Clivagem pela γ -secretase	10
1.3.4	Clivagem por caspases	11
1.4	O domínio intracelular da APP (AICD)	11
1.4.1	Proteínas que interagem com o AICD	12
1.4.2	Fosforilação do AICD	16
1.5	O método Dois-híbrido em levedura	17
1.6	Objectivos da tese.....	20
2	Procedimento experimental.....	21
2.1	Biblioteca de DNA.....	23
2.2	Proteína isco (Bait).....	23
2.3	Rastreio pelo método Dois - híbrido em levedura	24
2.3.1	Extracção de DNA plasmídico de levedura	24
2.4	Transformação em bactéria com o DNA plasmídico	25

2.4.1	Preparação de células competentes de <i>E.coli</i> XL1-BLUE.	25
2.4.2	Transformação de bactéria com DNA plasmídico.....	25
2.5	Extracção do DNA plasmídico de bactéria pelo método de lise alcalina	26
2.6	Análise de restrição dos plasmídeos por digestão com a endonuclease de restrição Hind III	27
2.6.1	Electroforese	27
2.7	Sequenciação de DNA	28
2.7.1	Purificação do DNA plasmídico em coluna	28
2.7.2	PCR de sequenciação	28
2.7.3	Precipitação com etanol	29
3	Resultados	31
3.1	Resultado do rastreio pelo método Dois-Híbrido a uma biblioteca de cérebro humano	33
3.2	Análise preliminar por restrição enzimática	34
3.3	Análise dos clones positivos por sequenciação	36
3.4	Análise bioinformática	36
3.4.1	FE65 – uma proteína que interage com o AICD	38
3.5	Análise dos restantes clones por restrição.....	39
3.6	Análise dos clones seleccionados por sequenciação	40
3.6.1	Sequenciação dos clones 142 e 127.....	42
4	Discussão.....	45
4.1	Detecção de interacções com o AICD pelo método dois híbrido	47
4.1.1	A FE65 formada pelo clone 127.4	48
4.2	Interacção do AICD com a FE65	49

4.2.1	Funções do complexo AICD\FE65	50
4.3	O AICD na forma nativa interage predominantemente com a FE65	52
4.4	A FE65 e a doença de Alzheimer	54
5	Bibliografia	57
	Apêndice	71
	Apendice I	73
	Apêndice II	77

Lista de abreviaturas

AICD – domínio intracelular da APP

APP – proteína precursora de amiloide de Alzheimer

A β – β -amiloide

BACE – enzima que cliva a APP no local β

CTF – fragmento do C-terminal

Gal4-AD – domínio de activação do GAL4

Gal4-BD – domínio de ligação do GAL4

KPI – domínio inibidor de proteases Kunit

PTB – domínio de ligação a fosfotirosinas

UAS – sequência de activação a montante

UTR – região não-traduzida

1 Introdução

1.1 A doença de Alzheimer

Cerca de 18 milhões de pessoas sofrem da doença de Alzheimer por todo o mundo e segundo a Organização Mundial de Saúde estima-se que este número duplique até 2025 [1]. Esta doença apresenta características neuropatológicas que foram descritas pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1907 referentes a um cérebro dissecado de uma mulher que morreu poucos anos depois de ter desenvolvido uma demência não-usual aos 51 anos [2].

Apesar de não afectar todas as pessoas do mesmo modo, manifesta vários sintomas semelhantes em várias fases. Numa primeira fase os sintomas são facilmente confundidos com o avançar da idade, nomeadamente pequenas perdas de memória de curto prazo e mudanças relativas do humor. Numa segunda fase os pacientes demonstram dificuldades linguísticas, de percepção, dificuldade de execução de movimentos mais complexos e uma acentuação da perda de memória mais recente [3-4]. Numa fase mais avançada os pacientes têm dificuldades notórias em falar, devido ao esquecimento do vocabulário. Lentamente o paciente perde a capacidade de ler e escrever. Os problemas de memória acentuam-se e as alterações de comportamento vão-se agravando [5-8]. Numa fase mais terminal, os pacientes ficam totalmente dependentes de terceiros, acabando por não conseguir desempenhar tarefas simples. A linguagem fica muito reduzida ou mesmo impossibilitada, podendo no entanto compreender e responder com sinais emocionais [9].

A doença de Alzheimer é caracterizada por mudanças degenerativas do sistema neurotransmissor, nomeadamente naqueles

que libertam glutamato, norepinefrina, e serotonina. Esta doença provoca a redução em regiões do cérebro específicas, como o córtex parietal e temporal, Figura 1, e regiões restritas no córtex frontal e hipocampo. A degeneração desses sistemas pode ser a causa de aspectos específicos associados à doença de Alzheimer [10]. Ao microscópio óptico, vêm-se claramente placas senis na matriz extracelular e tranças neurofibrilares intracelulares [11].



Figura 1 – Diferenças da perda neuronal em casos de doença de Alzheimer visualizados por um corte transversal. À esquerda a imagem de uma pessoa saudável e à direita o cérebro de um paciente que manifesta a doença de Alzheimer.

As placas senis foram identificadas como sendo agregados de um péptido, β -amilóide ($A\beta$) [12]. Este péptido tem uma constituição de 40 a 42 aminoácidos e deriva da proteína precursora de amilóide de Alzheimer (APP – “Amyloid Precursor Protein”) [13]. Estas descobertas levaram à formulação da hipótese amilóide, sugerindo que a sobreprodução de $A\beta$ e a sua agregação em placas senis pode ser a origem da doença de Alzheimer [14].

1.2 A Proteína Precursora de Amilóide de Alzheimer (APP)

A APP é uma glicoproteína transmembranar do tipo I com um domínio extracelular e um pequeno domínio intracelular, codificada por um único gene no cromossoma 21q21 [15-20]. Devido a "splicing" alternativo existem várias isoformas desta proteína. As isoformas mais predominantes são a APP₆₉₅ (exões 1 – 6, 9 – 18), APP₇₅₁ (exões 1 – 7, 9 – 18), e APP₇₇₀ (exões 1 – 18), Figura 2 [21]. A APP₆₉₅ é predominantemente expressa no tecido neuronal [22]. O péptido A β deriva de uma região da proteína codificada pelos exões 16 e 17 [23]. No entanto, esta proteína não está limitada às células neuronais, estando presente por quase todo o organismo, com diferentes proporções de isoformas em tecidos específicos [24-25].

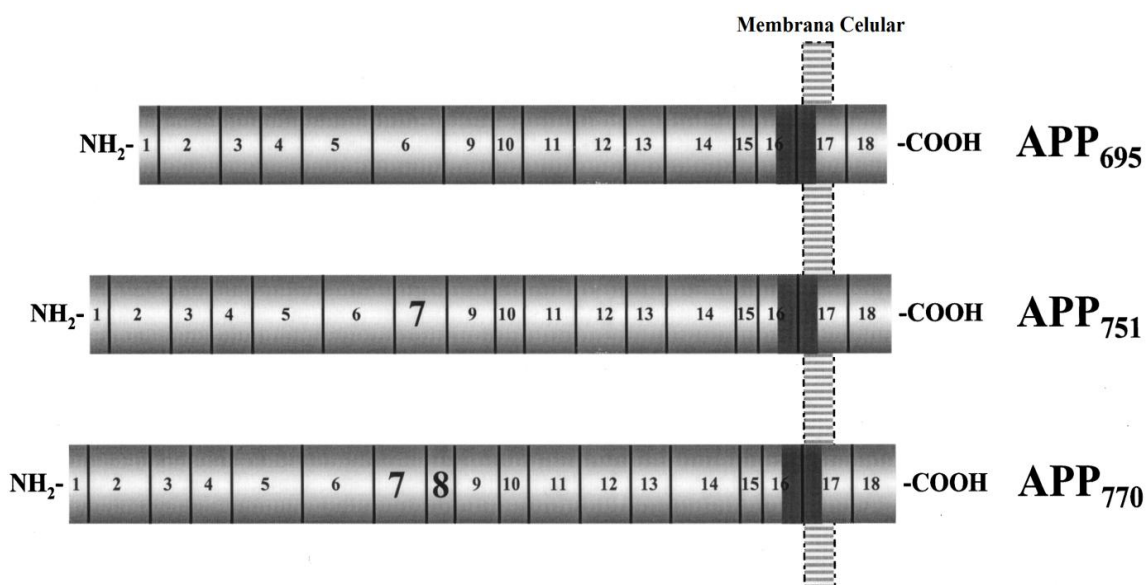


Figura 2 – Representação esquemática das isoformas da APP mais expressas (adaptada de da Cruz e Silva e da Cruz e Silva, 2003 [21]).

A APP é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso e posteriormente segue para o complexo de Golgi, acabando por chegar ao trans-Golgi. A APP pode também ser deslocada para vesículas secretórias e posteriormente desloca-se para a membrana plasmática.

Depois pode ser endocitada para endossomas e lisossomas [26]. A APP também foi localizada em locais de densidade pós-sináptica, axónios e dendrites [27].

1.2.1 Funções da APP

Há proteínas semelhantes à APP, denominadas de APLP1 e APLP2, e aparentam ter uma função semelhante à APP [28]. No entanto o fragmento correspondente ao A β está ausente. O silenciamento simultâneo dos genes da APP e das APLP's em ratinhos é letal na fase perinatal, sugerindo que a APP, a APLP1 e a APLP2 estão envolvidas em funções e vias de sinalização essenciais ao desenvolvimento e metabolismo normal [29].

A caracterização da APP revela que esta pode desempenhar funções de proteína de membrana receptora de moléculas. Estudos demonstram que a APP pode funcionar como um receptor típico de superfície acoplado à proteína G [30]. Os típicos receptores acoplados à proteína G₀ ligam-se a esta proteína induzindo dissociação do complexo trimérico da proteína G₀ em duas subunidades: a subunidade G α e o dímero G $\beta\gamma$. Ambas as subunidades podem activar vias de sinalização intracelular. Quando isto sucede, inúmeras cascatas de sinalização são activadas como a adenililcilase [31] ou a fosforilase C entre outras [32]. A ligação da APP à proteína G₀ envolve o domínio extracelular, APP₆₆₋₈₁ [30].

A APP foi identificada como interveniente na adesão celular em vários estudos [33-35]. Vários domínios promovem a ligação com substratos específicos como a heparina [36], o colagénio [37], e a laminína [38]. A co-localização com outras moléculas de adesão celular, β -1-integrinas [39] e telencefalina [40], demonstra que uma pequena fracção da APP é relativamente estável à degradação ao longo do tempo

[41] sugerindo que a APP poderá ter um papel importante de adesão celular.

A APP é transportada ao longo dos axónios para as sinapses centrais e periféricas [42-43]. Estudos realizados em ratinhos sugerem que a APP pode ter uma função importante na formação e manutenção de sinapses, assim como os diferentes níveis de expressão das isoformas [44]. O silenciamento da APP registou uma redução do alcance das dendrites nos neurónios do hipocampo e redução da actividade dos neurónios [45-47].

1.3 Processamento da APP

A APP pode sofrer clivagens sucessivas e originar vários fragmentos. Numa via amiloidogénica a APP ao ser clivada pela β -secretase vai originar dois fragmentos: do N-terminal vai libertar o sAPP β e do C-terminal vai ficar um fragmento com 99 aminoácidos, CTF99. Este último fragmento pode ser ainda clivado pelo complexo de γ -secretase originando dois fragmentos, o péptido A β e o restante domínio intracelular da APP. Contudo, a APP pode ser também processada de modo diferente. A APP pode ser clivada pela α -secretase originando dois fragmentos, sAPP α e CTF83. O CTF83 pode ser também clivado pelo complexo de γ -secretase e originar o péptido p3 e o restante domínio intracelular da APP. No entanto ambos os tipos de processamento culminam na libertação do domínio intracelular da APP (AICD) (Figura 3) [48].

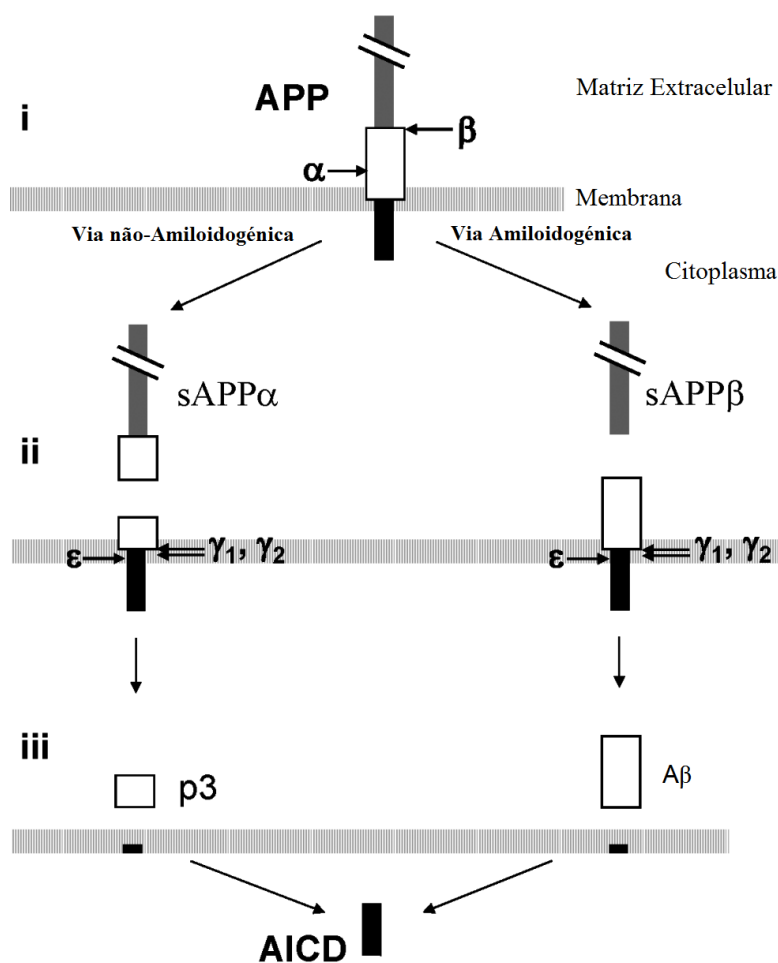


Figura 3 – Processamento da APP. (i) A primeira clivagem é realizada no domínio extracelular da APP pela α - ou β -secretase libertando sAPP α ou sAPP β e C83 ou C99. (ii) A posterior clivagem destes fragmentos é feita pela γ -secretase. Como resultado (iii) surge o péptido p3 ou o péptido A β e surge também o fragmento intracelular da APP, AICD (adaptada de Słomnicki e Leśniak, 2008 [48]).

1.3.1 Clivagem pela α -secretase

O local de clivagem da α -secretase é relativamente próximo da membrana, entre a lisina⁶¹² e a leucina⁶¹³, da isoforma APP₆₉₅. A clivagem neste ponto inibe a produção do péptido A β , produzindo um péptido solúvel, a sAPP α , e outro fragmento que fica na membrana que tem 83 aminoácidos (CTF83) [23]. As enzimas já identificadas com actividade de α -secretase são proteases pertencentes à família ADAM (desintegrinas e metaloproteinases), nomeadamente a MDC9 (também

denominada de meltrin γ), ADAM10 e ADAM17 (também denominada de TACE) [49]. A actividade desta família de enzimas é regulada por vários mecanismos na célula, que incluem a clivagem do prodomínio e a reacção directa com as suas cisteínas [46, 50-51]. As três α -secretases são sintetizadas como pré-proteínas e todas estas estão direccionadas para a mesma via de processamento celular. O prodomínio inibe a acção de proteases. A clivagem deste pro-domínio ocorre no complexo de Golgi [50, 52]. O silenciamento da ADAM17 provocou níveis deficientes de segregação de sAPP α [53]. Esta proteína é conhecida como enzima conversora factor α de necrose tumoral (TACE), que liberta a necrose tumoral da forma receptora [54]. *In vitro*, a ADAM10 demonstrou ter actividade de α -secretase [55].

A actividade de α -secretase foi identificada no *trans*-Golgi [56] e na membrana celular [55].

1.3.2 Clivagem pela β -secretase

A clivagem pela β -secretase ocorre entre os resíduos metionina⁵⁹⁶ e aspartato⁵⁹⁷ (da isoforma APP₆₉₅) [57]. Esta clivagem cria dois fragmentos, o fragmento N-terminal (sAPP β), e o fragmento C-terminal (CTF99). A sAPP β tem menos 17 aminoácidos que a sAPP α [58]. As enzimas responsáveis por estas clivagens foram identificadas como sendo aspartil proteases (BACE1 e BACE2) e ambas as enzimas estão ancoradas à membrana, embora a expressão da BACE1 seja maior que a da BACE2 [59].

A BACE1 (também conhecida como Aps2 ou memapsin2), é produzida como uma pro-enzima no retículo endoplasmático e no invólucro nuclear [60]. O pro-domínio é clivado por acção de furinas ou outras pro-proteínas convertases antes de se mover para o complexo de Golgi [61]. A clivagem pela BACE1, realizada *in vitro*, pode ser feita na posição Aps1 (local de clivagem β) ou Glut11 (local de clivagem β')

do péptido A β , produzindo fragmentos idênticos aos detectados *in vivo* [62], gerando assim A β 1 – 40/42 ou A β 11 – 40/42 respectivamente. A preferência do local está fortemente dependente da localização intracelular. Dentro do retículo endoplasmático a clivagem β é predominante, enquanto no *trans*-Golgi a clivagem β' é favorecida [63].

A BACE2 cliva a APP na posição 1 do péptido A β podendo também realizar a clivagem entre Phe-19 e Phe-20, resultando no aumento de sAPP α e produtos como p3, e na redução do péptido A β . Esta clivagem pode ocorrer no complexo de Golgi [64].

1.3.3 Clivagem pelo complexo γ -secretase

O complexo γ -secretase é responsável pela clivagem dos fragmentos C-terminal da APP, CTF83 e CTF99, numa região que se localiza dentro do domínio transmembranar [65] da APP originando p3 e A β respectivamente, sendo que esta clivagem liberta também o domínio intracelular da APP (AICD). γ -secretase é um complexo de proteínas de membrana com actividade aspartil protease [66]. A sua actividade depende de um complexo onde intervêm quatro proteínas: a presenilina-1 (PS1), a presenilina-2 (PS2), nicastrina (NCT) e APH-1 [67]. Esta actividade aparenta ser não selectiva, ocorrendo em pelo menos quatro locais de clivagem diferentes: valina⁶³⁶ (local γ 1), alanina⁶³⁸ (local γ 2) e leucina⁶⁴⁵ (local ϵ) da APP₆₉₅, Figura 3. A associação destas proteínas é feita através de um subcomplexo, NCT e APH-1. A glicosilação da NCT provoca mudanças conformacionais, permitindo a ligação da PS1, formando um complexo inactivo. Este complexo é clivado pela PS2 activando assim a γ -secretase [68-69].

1.3.4 Clivagem por caspases

A APP apresenta vários locais de clivagem libertando fragmentos do C-terminal para o citoplasma. O C-terminal pode ser clivado no resíduo 664 da APP₆₉₅, pelas caspases 3, 6, 8 e 9 formando assim CTF31, também denominado de AICD31 [70]. A caspase 3 cliva predominantemente a APP sendo detectado um nível elevado em neurónios mortos, estando também co-localizada com placas senis de A β . A formação do CTF31 acelera a formação e secreção do A β [71].

1.4 O domínio intracelular da APP (AICD)

Após a clivagem pela γ -secretase é libertado o domínio intracelular da APP. Consoante o local de corte, podem originar-se fragmentos de vários tamanhos. No local de clivagem γ 1 origina-se o fragmento CTF59. Se a γ -secretase clivar no local γ 2 origina o fragmento CTF57. No entanto estes fragmentos não foram identificados em modelos *in vivo* nem *in vitro*. É relatado, contudo, a existência de C50 resultante da clivagem no local ϵ pela γ -secretase [72].

O AICD apresenta vários motivos diferentes ao longo da cadeia de aminoácidos. Apresenta uma sequência de aminoácidos contendo um sinal de endocitose (⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷) que é responsável pela ligação a várias proteínas. Possui também outros motivos de ligação de proteínas, ⁶⁵³YTSI⁶⁵⁶ que é responsável pelo controlo da endocitose, e um motivo ⁶⁶¹VEVD⁶⁶⁴ onde clivam as caspases, que pode ter influência na apoptose. O AICD apresenta uma estrutura relativamente instável que consiste num conjunto hidrofóbico (I⁶⁵⁶–V⁶⁶⁷), uma hélice no N-terminal (⁶⁶⁷VTPEER⁶⁷²), uma volta β tipo 1 (⁶⁸⁴NPTY⁶⁸⁷) e uma hélice (⁶⁶⁴DAA⁶⁶⁶; S⁶⁷⁵–E⁶⁸³, K⁶⁸⁸–M⁶⁹³). Este facto sustenta a hipótese que a APP tem funções de proteína receptora de membrana [73]. A AICD pode mudar

estruturalmente devido a fosforilação, provocando mudanças na estrutura principal, variando os ângulos, alternado assim entre a isoforma *trans* ou *cis* do AICD, que muda a afinidade para se ligar a outras proteínas [74]. Quando a treonina⁶⁶⁸ está desfosforilada o AICD adquire a conformação *trans* [75], que confere mais afinidade para se ligar a algumas proteínas como por exemplo a FE65.

1.4.1 Proteínas que interagem com o AICD

São muitas as proteínas que interagem com o AICD, Figura 4, incluindo algumas que são necessárias para a função de transdução de sinais, transcrição de genes ou modelação da dinâmica membranar através do controlo da mobilidade da actina no citoesqueleto [73].

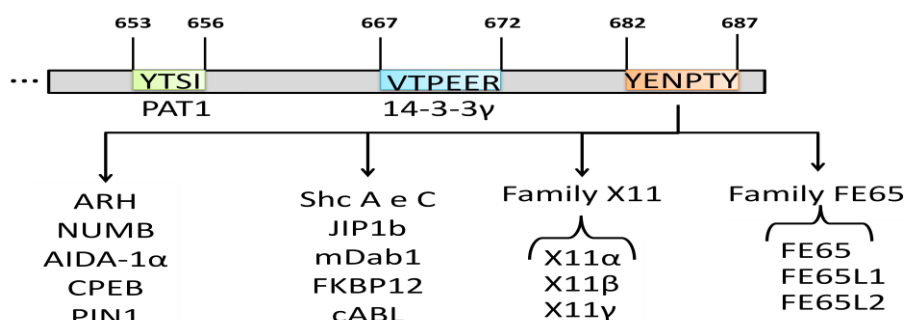


Figura 4 - Interação de algumas proteínas que envolvem o domínio citoplasmático da APP.

1.4.1.1 A família de proteínas FE65

A família FE65 é composta pela FE65, FE65L1 e FE65L2. São proteínas adaptadoras, que contêm múltiplos domínios de interação de proteína-proteína que formam complexos com diversas funções. As três proteínas têm três domínios de interação: domínio WW e dois domínios PTB (ligação fosfotirosina), Figura 5. Na FE65 humana o domínio WW

inicia-se no resíduo 254. A mesma região na FE65L1 e FE65L2 inicia-se no resíduo 291 e 30, respectivamente.

A FE65 é das três proteínas a mais expressa no cérebro [76]. A FE65 completa (p97FE65) pode ser sujeita a uma clivagem mesmo antes do domínio WW formando a FE65 e um fragmento de 65 kDa, aumentando assim a afinidade com a APP [77].

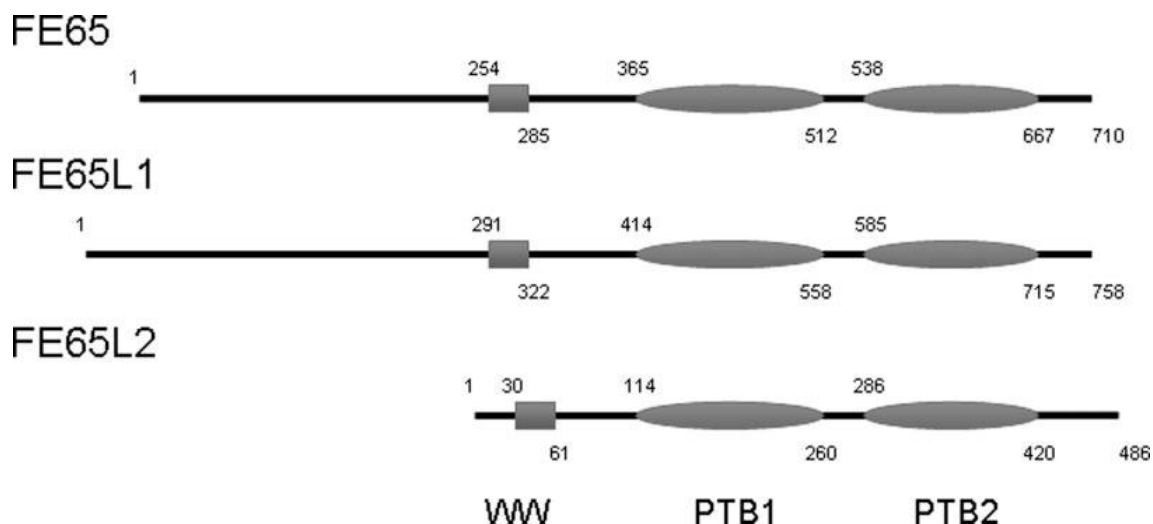


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da FE65, FE65L1 e FE65L2 (adaptado de McLoughlin e Miller, 2008 [75]).

A FE65 está presente no citoplasma e dentro do núcleo. A localização nuclear em conjunto com outros resultados [78-79] sugere que a FE65 participa em eventos de transcrição. O segundo domínio PTB (PTB2) liga-se à APP na sequência $^{682}\text{YENPTY}^{687}$ [80] re-internalizando-se com o AICD. O mesmo se sucede com a FE65L1 e FE65L2. Ambas as proteínas conseguem estabilizar o AICD [81]. A ligação entre as FE65 e o AICD é modulada pelo estado de fosforilação da treonina⁶⁶⁸ da APP₆₉₅, podendo ser abolida pela fosforilação ou mutação deste resíduo [74, 82]. A ligação da FE65 com a AICD visa formar um complexo activo na transcrição mas o mecanismo preciso ainda não é totalmente conhecido. Após a clivagem γ/ϵ , um complexo AICD/FE65 é libertado e o AICD estabiliza a FE65 junto à membrana onde, juntas ou

separadamente, poderão atravessar a membrana nuclear promovendo a transcrição de genes [83].

A FE65 consegue associar-se à Tip60 [78], podendo-se formar um complexo trimérico, AICD/FE65/Tip60 [79]. A Tip60 é uma proteína acetil transferase que pode formar complexos multiméricos que incluem ATPase, DNA helicase e DNA estrutural com actividade de ligação [84]. A formação destes complexos sugerem que a Tip60 tem um papel importante na transcrição, reparação e replicação de DNA [85]. A FE65 pode ainda interagir com o factor de transcrição CP2/LSF/LBP1, podendo formar um complexo multimérico com actividade de transcrição [86].

Outras proteínas que se ligam à FE65 podem formar complexos triméricos com o AICD/FE65. A 14-3-3 γ interage com a FE65 numa região localizada entre o domínio WW e o domínio PTB1. Esta proteína também tem a capacidade de se ligar à AICD, no motivo ⁶⁶⁷VTPEER⁶⁷², potenciando a transcrição [87].

A FE65 pode ainda ligar-se através do domínio PTB1 à proteína receptora de lipoproteínas de baixa densidade (LRP) e ligar com a APP formando o complexo LRP/FE65/APP [81]. Posteriormente, visualizaram-se interacções entre a ApoEr2 com a FE65, que se consumavam da mesma forma que as ligações com a LRP, formando um complexo trimérico ApoEr2/FE65/APP [88]. Estas interacções tendem a regular as interacções da FE65 com a Tip60 [89].

1.4.1.2 A Família de proteínas X11/Mint

A família X11 é uma família de proteínas adaptadoras que contêm domínios de interacção de proteínas de modo a poder controlar a formação de complexos com várias funções, como por exemplo, reunir diferentes complexos de sinalização ou tráfego. São proteínas

conhecidas por estarem envolvidas em vários processos membranares, citoplasmáticos e nucleares [90].

Esta família proteica é composta por três proteínas: X11 α , X11 β e X11 γ . Todas possuem estruturas comuns e têm um elevado grau de semelhança no C-terminal. Contêm um domínio PTB, pelo qual se ligam ao AICD no domínio ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ [91]. Este domínio pode ligar-se eventualmente com o domínio PTB da X11 γ [92]. As X11s contêm também dois domínios PDZ, que se ligam preferencialmente a sequências nos C-terminais de outras proteínas, podendo-se ligar também a outros domínios PDZ ou outras sequências [93]. No entanto as proteínas são diferentes no N-terminal. A X11 α possui um domínio de interacção com a proteína pré-sináptica CASK que a X11 β e a X11 γ não possuem [94] e a X11 γ não possui um domínio de ligação à proteína que se liga a vesículas sinápticas Munc18 [95]. Expressam-se de forma diferente nos neurónios. A X11 α e a X11 β expressam-se nos neurónios, apesar da X11 α se expressar mais nas estruturas límbicas, nomeadamente o hipocampo, enquanto a X11 β é altamente expressa por todo o cérebro [96]. A X11 γ é ubíqua [92].

A sobre-expressão de X11 α e X11 β demonstra uma diminuição na quantidade de A β [97]. Existem várias teorias para esta inibição. Uma possibilidade é que as proteínas X11 alteram o tráfego da APP, expondo-a a menos locais onde as γ -secretases actuam. Outra baseia-se na possibilidade das proteínas X11 podem afectar a clivagem pela γ -secretase ligando-se à PS1, formando um complexo trimérico APP/X11/PS1 [90]. No entanto a regulação da actividade de γ -secretase não é conhecida.

A X11 pode ainda regular indirectamente a BACE1. O domínio PDZ2 liga-se à proteína CCS, resultando numa diminuição da actividade da proteína SOB1 [98]. O N-terminal da CCS liga-se ao domínio citoplasmático da BACE1 regulando a sua actividade [99].

1.4.1.3 Outras proteínas que interagem com o domínio intracelular da APP

A PAT, PAT1 ou PAT1a, podem regular o nível da APP na superfície das células, intervenindo na conversão proteolítica, sugerindo que tem função de regulação do transporte da APP [100].

Outras proteínas, como a PIN1 (peptidil-prolil isomerase) e a FKBP (imunofilina) foram identificadas como proteínas que interagem com o AICD, acelerando a modificação entre os isómeros *cis/trans* do AICD, podendo alterar o processamento da APP e a produção de A β [101-102].

Ensaio de imunoprecipitação revelam que a ShcA e a ShcC se associa com a APP. Esta associação é feita pela tirosina⁶⁸². O facto de a ShcA e a ShcC interagirem com o AICD, relaciona a APP com a sobrevivência celular, pois a ShcA e a ShcC controlam a proliferação e diferenciação celular e neuronal [103].

1.4.2 Fosforilação do AICD

Estados físicos de APP fosforilada foram observados em neurónios [104]. A fosforilação induz mudanças conformacionais na AICD que regula interacções entre proteínas, modulando a transcrição e funções sinalizadoras, podendo ter um papel importante directamente na regulação do processamento da APP.

A treonina⁶⁶⁸ e a tirosina⁶⁸² podem ser fosforiladas. A fosforilação da Treonina⁶⁶⁸ foi identificada como sendo efectuada por várias enzimas: em situações de estímulos de stress a c-Jun NH2-terminal cinase-1 ou -3 (JNK-1 ou JNK-3) [105-106], que se junta ao AICD através da acção da JIP1 ou JIP3 (proteínas que interagem com a JNK) dando origem a transporte axonal [107]. No entanto, a fosforilação pode ocorrer pela acção da Cdk5 (cinase dependente de ciclina activa)

[104] e da GSK3 β (glicogénio sintetase cinase 3 β) [108] em neurónios; e a CDC2 cinase durante a fase G2/M do ciclo celular [109]. A fosforilação da treonina⁶⁶⁸ facilita a clivagem da APP pela BACE1 [110]. A tirosina⁶⁸² é fosforilada principalmente pela cAbl (tirosina cinase activa) [111].

1.5 O método Dois-híbrido em levedura

A chave de muitos processos biológicos, como transdução de sinal e transcrição, é a interacção de proteínas. Como as interacções proteína – proteína são tão importantes há vários métodos para detectar as interacções, em que cada uma das abordagens tem os seus próprios pontos fortes e fracos, especialmente no que diz respeito à sensibilidade e especificidade do método.

Fields e Song (1989) [112] descreveram o primeiro sistema Dois-híbrido. A concepção fundamental é que os factores de transcrição em eucariotas têm domínios de ligação e activação separáveis. Em particular a proteína de interesse é fundida com o domínio de ligação ao DNA do factor de transcrição Gal4 (Gal4-BD) e a segunda proteína é fundida ao domínio de activação Gal4 (Gal4-AD). As proteínas ao interagirem vão aproximar os dois domínios ligando-se ao promotor UAS-Gal4, iniciando assim a transcrição de um gene pela RNA polimerase II. A interacção das proteínas é detectada através da expressão de um ou mais genes repórter.

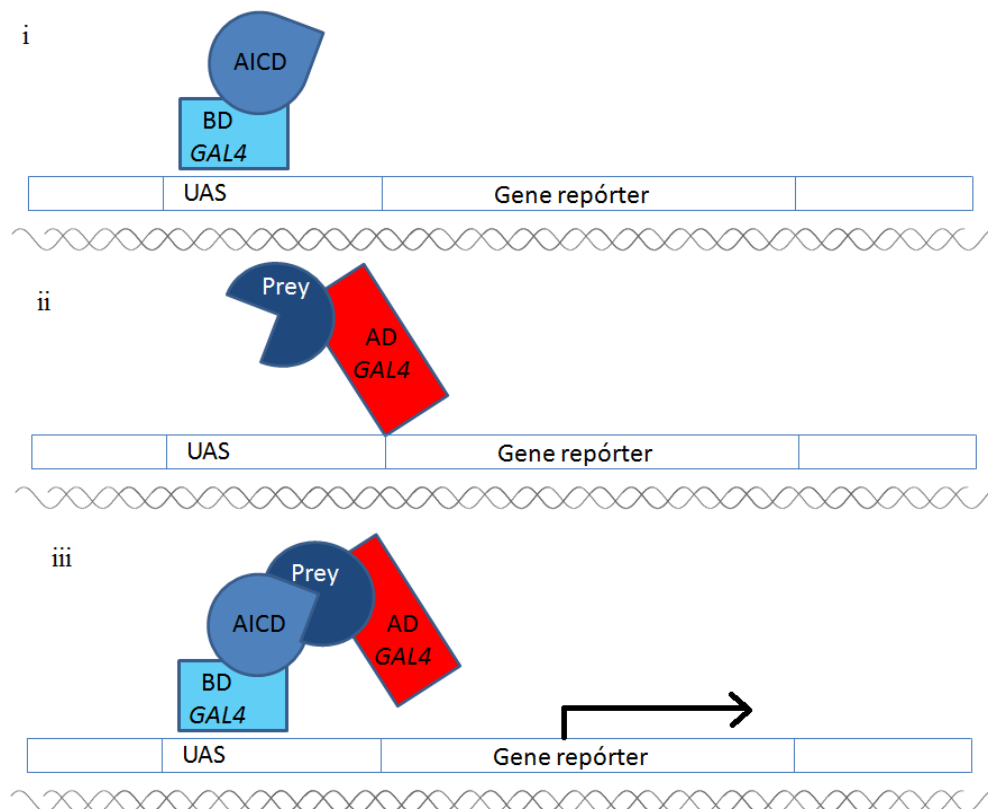


Figura 4 – Método Dois-híbrido em levedura. Duas proteínas híbridas são expressas em levedura: o domínio de ligação ao DNA do Gal4 é fundido com a proteína de interesse e o domínio de activação do Gal4 é fundido com uma proteína de uma biblioteca de expressão. (i) O domínio de ligação consegue reconhecer na cadeia de DNA o local de ligação (UAS) mas não consegue activar a transcrição. (ii) O domínio de activação não consegue reconhecer o local de ligação e consequentemente não activa a transcrição. (iii) Quando as duas proteínas interagem o domínio de ligação e o domínio de activação ficam próximos iniciando a transcrição.

A grande vantagem deste método é a disponibilidade imediata do gene clonado para a proteína de interacção. Além disso, apenas é necessária a construção de um único plasmídeo, não havendo necessidade de preparar um anticorpo ou purificar proteínas. Com este método bibliotecas de cDNA podem ser facilmente rastreadas de modo a detectar as proteínas que interagem com a proteína de interesse. As bibliotecas de cDNA que se fundem com o domínio de activação podem ser obtidas de diferentes tipos de células ou estados celulares diferentes, identificando assim interacções que apenas se dão em algumas fases do ciclo celular. É possível também detectar interacções entre proteínas que tenham um tempo de semi-vida curto. O método

Dois-híbrido permite investigações como mapeamento de motivos ou resíduos intervenientes na interacção proteína-proteína [113].

No entanto podem detectar-se falsos positivos, proteínas que sem interagir com a proteína de interesse vão activar o gene repórter. Um número significativo de variações deste método utiliza várias sequências UAS-GAL4 que dão início à transcrição de vários genes repórter independentes (ADE2, HIS3 e MEL1). Assim diminui-se a probabilidade de se originarem falsos positivos pois a proteína ligada ao domínio de activação do Gal4 vai ter de se ligar aos vários motivos UAS-GAL4.

Uma limitação deste método é a detecção de interacções dependentes de modificações pós-translacionais que ocorrem no retículo endoplasmático, como glicosilações. Além disso as proteínas podem solicitar outras modificações para as interacções, como fosforilações ou acetilações, o que pode influenciar a visualização da interacção entre proteínas [113].

Após identificar novas interacções com a proteína de interesse é necessário comprovar a interacção *in vivo* e realizar experiências para caracterizar a relevância funcional, estrutural e regulação da interacção observada.

1.6 Objectivos da tese

Apesar de serem conhecidas muitas interacções com o domínio intracelular da APP as suas funções na célula ainda não estão bem esclarecidas. Com o intuito de clarificar a sua função, neste trabalho tentou-se identificar proteínas que interagem com o domínio intracelular da APP (AICD).

Para tal os objectivos específicos são:

1. Efectuar um rastreio em larga escala de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano pelo método dois-hibrido em levedura utilizando o AICD como a proteína de interesse (trabalho prévio já efectuado pelo laboratório);
2. Isolar o DNA plasmídico dos clones positivos;
3. Seleccionar os plasmídeos de biblioteca pela transformação em *E.coli* e análise de restrição;
4. Sequenciação dos cDNAs seleccionados;
5. Análise bioinformática.

2 Procedimento experimental

Os reagentes utilizados, bem como os meios, culturas e soluções estão descritos no Apêndice I.

2.1 Biblioteca de DNA

Neste trabalho efectuou-se um rastreio a uma biblioteca de cDNA de cérebro humano. A biblioteca foi construída a partir de cérebro total ao qual foi extraído o RNA total. O mRNA é isolado e a primeira cadeia de cDNA é sintetizada usando a enzima transcriptase reversa. A segunda cadeia é sintetizada com a incubação com DNA polimerase I e o cDNA é digerido com enzimas de restrição. O cDNA é fundido com domínio de activação de Gal4 e incorporado em plasmídeos pACT-2. Os plasmídeos foram depois transformados em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe AH109.

2.2 Proteína isco (Bait)

Para produzir a proteína isco foi feito um isolamento do plasmídeo pAS2-1 e digerido com enzimas de restrição e purificado o DNA plasmídico. O AICD50 foi amplificado por PCR, digerido com enzimas de restrição e purificado. A ligação entre o AICD50 e o plasmídeo foi então realizada inserindo o AICD50 humano em grelha com o domínio de ligação do Gal4 no plasmídeo pAS2-1. Transformou-se em bactéria e isolou-se o DNA plasmídico que posteriormente foi transformado em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe Y187.

2.3 Rastreio pelo método Dois - híbrido em levedura

Foi efectuado o rastreio em larga escala com as leveduras anteriormente transformadas. Isolaram-se os clones positivos putativos e foram repicados para placas SD\QDO\X- α -gal para testar a activação do gene repórter. Os clones que cresceram e adquiriram cor azul foram guardados em 25% de glicerol a -80°C até serem analisados.

Para análise de cada clone positivo, o procedimento adoptado foi semelhante e inclui:

- Extracção de DNA plasmídico de levedura,
- Transformação em bactéria,
- Extracção de DNA plasmídico,
- Análise por restrição enzimática,
- Sequenciação.

2.3.1 Extracção de DNA plasmídico de levedura

Colocou-se uma colónia de levedura a crescer em 4 mL de SD/TDO durante 2 dias a 30°C a 180 rpm. A cultura foi transferida para microtubos, centrifugou-se a 14000 rpm e ressuspendeu-se o pellet em 100 μ L de STET. Adicionou-se cerca de 300 μ L de glass beads (425-600 μ m, Sigma) e agitou-se ao vórtex durante 6 min. De seguida, adicionou-se 100 μ L de STET e estes foram fervidos durante 3 min e arrefecidos logo em gelo. Centrifugaram-se os tubos durante 20 min a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, adicionou-se 500 μ L de acetato de amónio a 7,5 M e incubou-se a -20°C durante a noite. Posteriormente centrifugaram-se os tubos durante 20 min a 14000 rpm a 4°C e transferiu-se 400 μ L para novos tubos. Adicionou-se 1 mL de etanol a 100% e incubou-se durante 20 min a -20°C. Centrifugou-se os tubos durante 10 min a 14000 rpm a 4°C e

removeu-se o sobrenadante. Adicionou-se 800 μL de etanol a 70% e incubou-se a 20°C durante 5 min. Centrifugou-se novamente os tubos e removeu-se o sobrenadante. O pellet foi seco num aparelho de vácuo (SpeedVac 1000). Ressuspendeu-se o pellet em 30 μL de RNase a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4 Transformação em bactéria com o DNA plasmídico

2.4.1 Preparação de células competentes de *E.coli* XL1-BLUE

Incubou-se uma colónia de *E.coli* XL1-BLUE em 10 mL de SOB a 37°C durante cerca de 12 horas. Inoculou-se 1 mL desta cultura em 50 mL de SOB e incubou-se durante 1 – 2 horas a 37°C com agitação de 220 rpm até a $\text{DO}_{550\text{nm}}=0,3$. Arrefeceu-se a cultura em gelo durante 15 min e centrifugou-se a 4000 rpm durante 5 min a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 15 mL de solução I. De seguida incubou-se em gelo durante 15 min e depois centrifugou-se durante 15 min a 4000 rpm a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet e 3 mL de solução II, dividiu-se em alíquotas de 100 μL e congelou-se rapidamente em azoto líquido. As alíquotas foram guardadas a -80°C

2.4.2 Transformação de bactéria com DNA plasmídico

Adicionou-se 50 μL de células competentes (XL1-Blue *E.coli*) ao DNA plasmídico extraído de levedura em gelo agitando-se suavemente. Incubou-se em gelo durante 20 min. As células foram submetidas a 42°C durante 90 seg e de seguida incubaram-se no gelo por 30 min. Adicionou-se 800 μL de SOC e incubou-se a 37°C durante 75 min com agitação de 180 rpm. Centrifugaram-se os tubos a 14000 rpm durante 2 min e removeu-se o sobrenadante. O pellet foi espalhado em placas

de LB com ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

2.5 Extracção do DNA plasmídico de bactéria pelo método de lise alcalina

Colocou-se uma colónia a crescer em 2 mL de LB com ampicilina (100 µg/mL) entre 16 – 18 horas a 37°C com agitação de 180 rpm. Transferiu-se a cultura para microtubos. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 2 min e removeu-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 100 µL de Solução I no vortex. Adicionou-se 200 µL de Solução II e inverteu-se algumas vezes. De seguida adicionou-se 150 µL de Solução III e inverteram-se os tubos algumas vezes. Os tubos foram colocados em gelo durante 5 min. Centrifugaram-se os tubos a 14000 rpm durante 10 min a 4°C e transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos e fez-se uma nova centrifugação a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos e adicionou-se 900 µL de etanol a 100% (v/v). Incubou-se os tubos a -20°C durante 30 min. Centrifugou-se os tubos a 14000 rpm durante 10 min a 4°C e removeu-se o sobrenadante. Adicionou-se 750 µL de etanol a 70% (v/v) e incubou-se a -20°C durante 5min. Centrifugaram-se os tubos a 14000 durante 5 min e removeu-se o sobrenadante. O pellet seco foi num aparelho de vácuo (SpeedVac 1000) durante 10 min. Ressuspendeu-se o DNA em 50 µL de solução de H₂O que contém RNase a 20 µg/mL.

2.6 Análise de restrição dos plasmídeos por digestão com a endonuclease de restrição Hind III

A análise dos plasmídeos foi feita por reacção enzimática com Hind III. A digestão do DNA foi feita segundo as instruções do fabricante.

Num micro tubo foi adicionado:

- 100 µg/mL de DNA,
- 1x Tampão de reacção (especifico de cada enzima),
- 1 U/µg DNA da enzima de restrição.

A mistura foi incubada a 37°C durante umas horas (ou durante a noite, se for conveniente).

2.6.1 Electroforese

Para preparar um gel de agarose a 0,8% pesou-se 0,8g de agarose e adicionou-se 100mL de TAE 1X. A solução foi aquecida para melhor solubilização da agarose no microondas deixando-se arrefecer enquanto se preparava o suporte do gel. Acrescentou-se 10 µL de Brometo de Etídeo (10 mg/mL) e misturou-se com agitação leve. Verteu-se a solução de gel no suporte e colocou-se o pente com o número de poços desejados e deixou-se o gel solidificar. Colocou-se o suporte com o gel na tina de eletroforese e adicionou-se tampão TAE 1X até cobrir a superfície do gel. Ao DNA digerido com HindIII adicionou-se 3 µL de tampão de carregamento (Loading Buffer). Aplicaram-se as amostras no gel e aplicou-se também 5 µL de padrão de corrida (1kb Ladder - invitrogen) em dois poços. A corrida realizou-se com uma diferença de potencial de 100 V. Após a frente de corrida percorrer 1/3 do gel parou-se a electroforese, tirou-se o gel e analisou-se sob radiação ultravioleta (Alpha Imager)

2.7 Sequenciação de DNA

2.7.1 Purificação do DNA plasmídico em coluna

Para a purificação do DNA plasmídico foi utilizado um kit comercial QIAquick (QIAGEN).

Adicionou-se 5 volumes de tampão PB a 1 volume de solução de DNA e misturou-se. Transferiu-se para uma coluna QIAquick colocado num microtubo colector. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 1 min. Removeu-se o filtrado resultante e lavou-se a coluna com 750 µL de tampão PE, centrifugando a 14000 rpm durante 1 min e removeu-se o filtrado resultante. Centrifugou-se novamente para remover vestígios do tampão de lavagem. Colocou-se a coluna num microtubo limpo, adicionou-se 50 µL de água durante 1 min. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 1 min e recolheu-se a solução resultante.

2.7.2 PCR de sequenciação

Foi feito o PCR para saber a sequência de cada clone. Para se fazer a reacção de PCR adicionou-se num tubo de 0,2 mL:

200-500 ng de DNA,

1 µL primer AD,

4 µL de mix de sequenciação (Applied Biosystems),*

Perfez-se com H₂O até 20 µL.

Tabela 1 – Primers utilizados na sequenciação dos clones. O primer 5' foi utilizado na sequenciação de todos os clones enquanto o primer 3' apenas foi utilizado para sequenciar os clones 142 e o 127.4.

Primer	Sequência
GAL4-AD	5' – TACCACTACAATGGAT – 3'
3' AD amplimer	5' – ATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCAC – 3'

* A mix de sequenciação é composta por tampão, AmpliTaq DNA polimerase, FS, desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs), $MgCl_2$, dye terminators (didesoxiribonucleótidos marcados com fluoróforos, ddNTPs) e rTth pirofosfatases.

Agitou-se muito suavemente a mistura e a reacção de PCR foi realizada com vários ciclos de temperatura:

1 min a 96°C	
30 seg a 96°C,	} 25 ciclos
15 seg a 42°C,	
4 min a 60°C.	

2.7.3 Precipitação com etanol

A reacção de sequenciação foi precipitada com etanol para remover os nucleótidos não incorporados.

Aos tubos foi adicionado 0,1 volumes de acetato de sódio a 3 M e 2,5 volumes de etanol 100%. Incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente. De seguida centrifugou-se durante 20 min à temperatura ambiente a 14000 rpm. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 250 μL de etanol a 70%. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 5 min. O pellet foi seco e a amostra foi sequenciada pelo sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 310, Applied Biosystems).

3 Resultados

3.1 Resultado do rastreio pelo método Dois-Híbrido a uma biblioteca de cérebro humano

Foi preparada uma cultura de levedura com a estirpe que continha a proteína isco e combinou-se com uma estirpe que continha a biblioteca. A mistura foi incubada durante 24h para permitir a conjugação (Mating) das leveduras e plaqueou-se em meio SD\QDO\Kan. Após alguns dias as colónias apareceram. Realizou-se uma contagem para calcular a eficiência e os clones no rastreio.

Tabela 2 – Resultados do rastreio pelo método Dois-híbrido em levedura

Clones positivos	Eficiência do Mating (% de diploides)	Clones rastreados
347	0.1	3×10^3

Para calcular o número de clones rastreados foi usada a seguinte equação:

$$[n^{\circ} \text{ de CFU/mL de diploides} \times \text{volume de ressuspensão}].$$

Para calcular a eficiência do Mating foi usada a equação sugerida pelo manual Dois-híbrido em levedura [114]:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de CFU (em SD - Leu/-Trp)} \times 1000 \mu\text{L/mL}}{\text{volume plequeado}(\mu\text{L}) \times \text{factor de diluição}} \times 100$$

O rastreio resultou em 347 clones positivos entre os 3×10^3 clones rastreados.

3.2 Análise preliminar por restrição enzimática

Ao analisar os clones, numa primeira fase foi feita uma escolha aleatória de clones de várias placas. Estes clones foram submetidos a uma extracção de DNA plasmídico, transformação em bactéria onde foram escolhidas três colónias cujo os plasmídeos foram analisados por digestão enzimática com HindIII. Esta digestão origina diferentes fragmentos no plasmideo que contém a biblioteca de cDNA ou no plasmideo que contém a sequência do AICD, Figura 5. Após a digestão enzimática, a electroforese em gel de agarose permitiu seleccionar os plasmídeos que continham a biblioteca de cDNA, Figura 6.

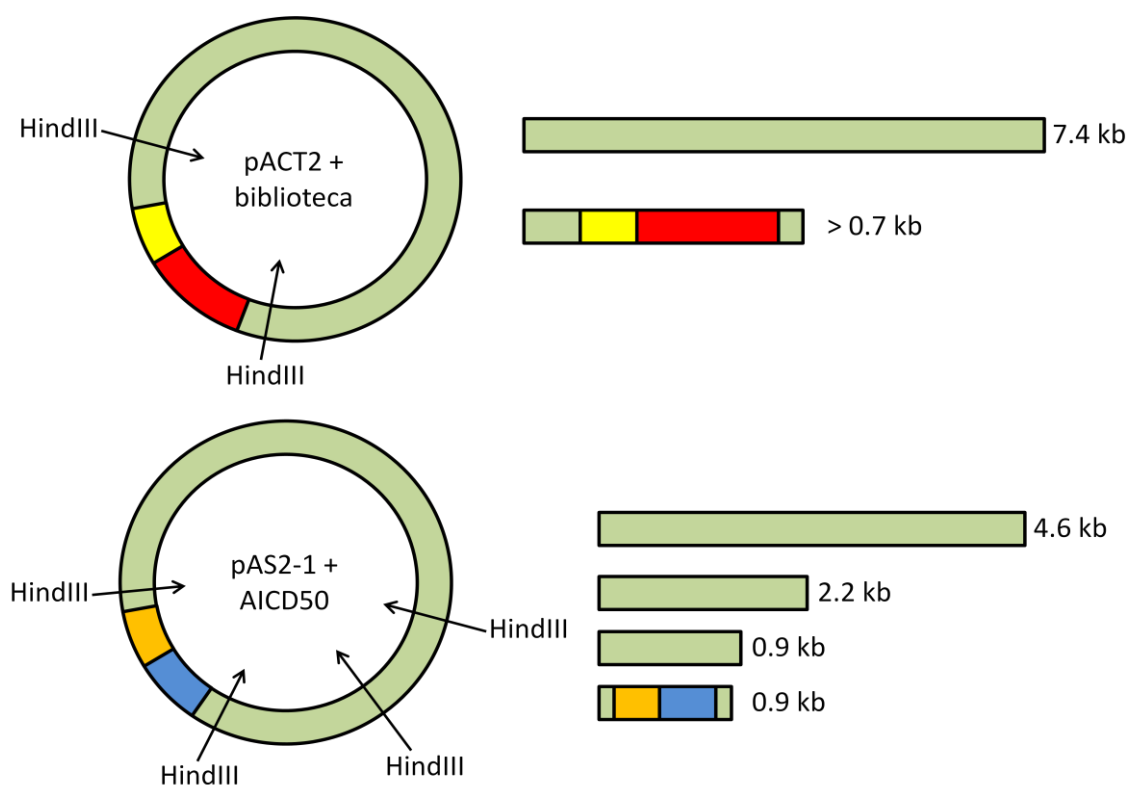


Figura 5 – Diferenças esquemáticas entre a digestão do plasmideo pACT2 que continha um cDNA de biblioteca e o plasmideo pAS2-1 que contém o cDNA que codifica o AICD.

Os plasmídeos que após a electroforese apresentavam uma banda a 4.6 kb não foram analisados, pois esta é uma banda característica da proteína isco, Figura 5.

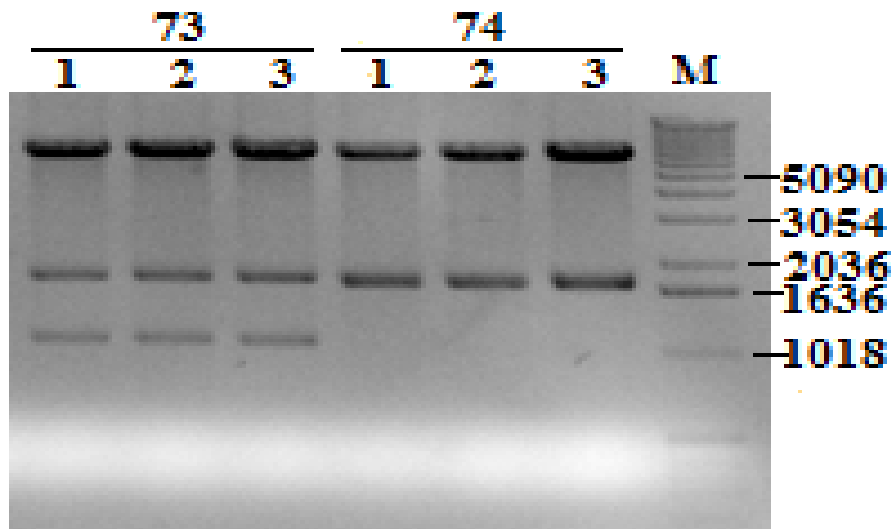


Figura 6 – Exemplo de um gel de agarose com a digestão dos plasmídeos de bactéria dos clones 73 e 74. (M) marcador de peso molecular utilizado foi 1 kb ladder.

Os restantes géis apresentavam duas bandas comuns, a 7.4 kb e a 1.7 kb, Figura 6. Observou-se também a presença de outras bandas a 1.6, 1.2, 0.9 e 0.7 kb.

Tabela 3 – Resultados da restrição enzimática com HindIII dos clones.

Grupo	Restrição com HindIII	Identificação do Clone	Insert (kb)
A	7.4+1.7+1.7	53,	2.7
B	7.4+1.7+1.6	4, 5, 9	2.6
C	7.4+1.7+1.2	2; 3; 15, 19, 24, 26, 33, 42, 47, 54, 56	2.1
D	7.4+1.7+0.9	21, 27, 31	1.9
E	7.4+1.7+0.7	35, 36, 37, 39, 41, 43, 44, 45, 46	1.7

Agruparam-se os clones por tipo de restrição enzimática, Tabela 3. Os clones que apresentaram ter bandas de 7.4 e a 1.7 kb foram agrupados no grupo A. Aqueles que apresentaram bandas de 7.4, 1.7 e 1.6 kb foram agrupados no grupo B. Os clones que apresentaram bandas de 7.4, 1.7 e 1.2 foram agrupados no grupo C enquanto os clones que apresentaram bandas de 7.4, 1.7 e 0.9 kb foram agrupados

no grupo D. Por fim os clones que apresentavam bandas de 7.4, 1.7 e 0.7 kb foram agrupados no grupo E.

3.3 Análise dos clones positivos por sequenciação

Os cDNAs de biblioteca provenientes dos clones positivos foram analisados por sequenciação automática. As sequências foram visualizadas com o programa Chromas 1.45, Figura 7.

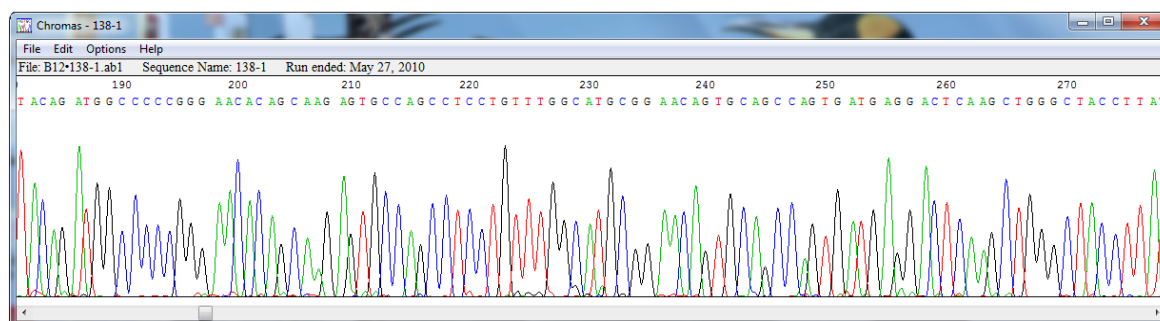


Figura 7 – Exemplo dos resultados das sequenciações, neste caso o clone 138.

3.4 Análise bioinformática

As sequências foram extraídas em formato FASTA. Estes dados foram inseridos numa ferramenta bioinformática, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Figura 8, para fazer alinhamentos das sequências de nucleótidos com sequências conhecidas em bases de dados. Foram então escolhidos os alinhamentos com proteínas já conhecidas e descritas.

Figura 8 – Janela de BLAST do site do NCBI onde foram introduzidas as sequências para fazer o alinhamento.

O resultado do alinhamento revela que as sequências obtidas codificam para a proteína FE65 com locais de iniciação diferentes, indicando que os cDNAs sequenciados tiveram início de transcrição em nucleótidos diferentes, Tabela 4.

Tabela 4 – Tabela com os clones sequenciados. Os clones foram dispostos pelo grupo de restrição enzimática e por início por nucleótido em que começava a sequência.

Grupo	Identificação do Clone	Insert (kb)	Alinhamento do BLAST	Cromossoma	CDS	Início
A	53,	2.7	Fe65 transcript var 1	11p15	101-2233	6
B	4, 5, 9	2.6	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	151
C	2, 3	2.1	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	571
C'	15, 19, 24, 26, 33, 42, 47, 54, 56	2.1	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	616
D	21, 27, 31	1.9	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	813
E	35, 36, 37, 39, 41, 43, 44, 45, 46	1.7	Fe65 transcript var 1	11p15	101-2233	982

Através do alinhamento do BLAST pode-se ver qual a proteína que é codificada, o cromossoma a que pertence, a localização da sequência de codificação e o nucleótido onde se forma o codão de início da proteína. O grupo C' apresentou a mesma restrição enzimática que o grupo C mas o início do cDNA de biblioteca e em nucleótidos diferentes.

3.4.1 FE65 – uma proteína que interage com o AICD

A FE65 é uma proteína bastante conhecida que tem o gene localizado no cromossoma 11, que pode originar duas variantes, E9 e Δ E9, com 710 e 708 aminoácidos respectivamente [115]. Pelos resultados da sequenciação com primer GAL4-AD não se consegue diferenciar as duas variantes da FE65. A FE65-E9 e a FE65- Δ E9 são diferentes em nucleótidos antes do início do codão de iniciação (5'UTR) e são diferentes do nucleótido 1489 ao 1494, Figura 9.



Figura 9 – Alinhamento das duas variantes da FE65. Em cima encontra-se a variante E9 da FE65 e por baixo encontra-se a variante Δ E9 da FE65.

Como se pode verificar através do mapa de restrição do plasmídeo pACT2 com a FE65, Figura 10, a sequência de aminoácidos da proteína FE65 também pode ser cortada pela HindIII. Este corte origina duas bandas, uma de 1,7 kb de tamanho constante e uma banda de menor tamanho. Após a sequenciação foi observado que os clones iniciavam em nucleótidos diferentes, pois as bandas formadas pela restrição enzimática variavam consoante o nucleótido em que se iniciava a transcrição do clone.

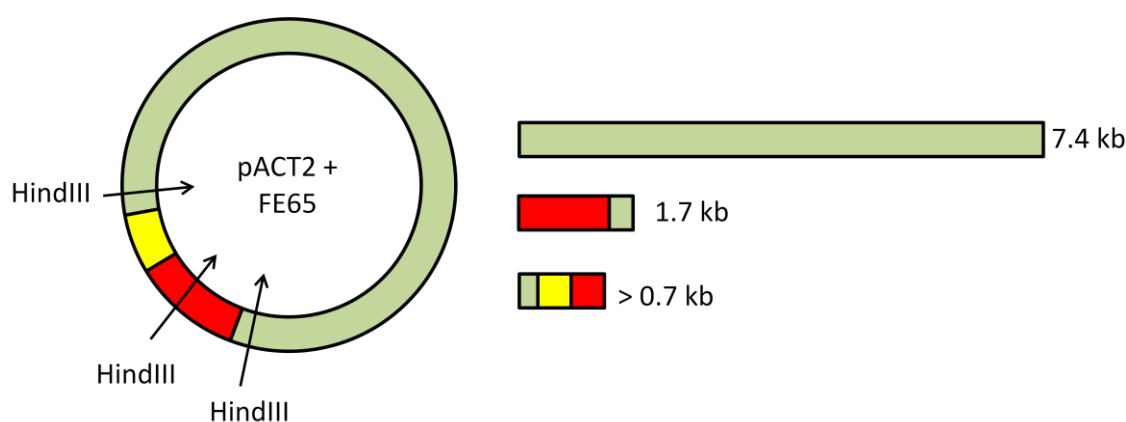


Figura 10 – Representação esquemática da digestão com HindIII do plasmídeo pACT2 que contém o cDNA que codifica para a FE65.

3.5 Análise dos restantes clones por restrição

Os restantes clones positivos foi extraído o DNA plasmídico, foram transformados em bactéria e analisados por digestão enzimática com HindIII (géis de agarose são apresentados no Apendice II). Após a analisar os fragmentos de restrição com HindIII dos restantes clones positivos obtiveram-se grupos de restrição de A-F, Tabela 5.

O grupo F não tinha sido observado na primeira vez que foi realizada a análise por restrição enzimática. Este grupo apresentava bandas de 7.4, 1.4 e 1.1 kb, Figura 11.

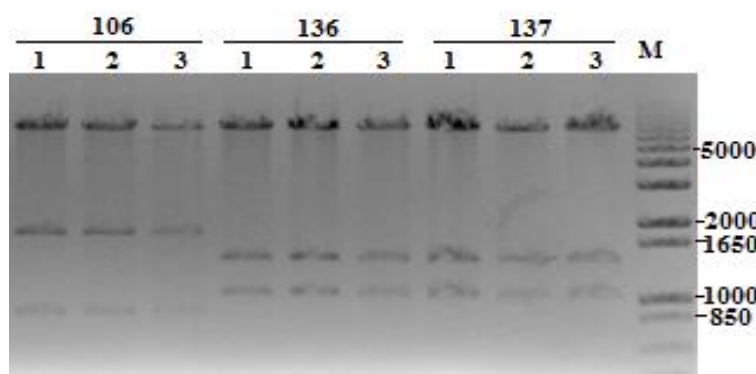


Figura 11 – Gel de agarose dos clones 106, 136 e 137. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder plus.

Ao realizar a transformação e posterior digestão com HindIII dos clones 127 e 198 observou-se que cada um deles continha dois plasmídeos de biblioteca diferentes. Ao digerirem-se os plasmídeos provenientes de bactéria do clone 127 observou-se que este continha dois tipos de digestões diferentes, uma que apresentava bandas de 7.4, 1.7 e 0.9 kb e outra que apresentava bandas de 7.4, 1.4 e 0.4 kb. Nas digestões do clone 198 também se observou duas digestões diferentes, uma que tinha bandas de 7.4, 1.7, e 0.9 kb e outra que continha bandas de 7.4 e 1.4 kb.

Tabela 5 – Resultados da restrição enzimática com HindIII dos clones.

Grupo	Restrição com HindIII	Insert (kb)	Identificação do Clone
A	7.4+1.7+1.7	2.7	11; 74; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 104; 108; 109
B	7.4+1.7+1.6	2.6	7, 8; 10;
C	7.4+1.7+1.2	2.2	12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 24; 25; 26; 33; 34; 42; 47; 48; 49; 51; 52; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 75; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 227; 230 - 347;
D	7.4+1.7+0.9	1.9	21; 23; 27; 29; 30; 31; 32; 103; 105; 106; 107; 121; 122; 123; 124; 125; 126; 127; 128; 129; 130; 131; 132; 133; 134; 135; 149; 150; 151; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 160; 161; 162; 163; 164; 165; 166; 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174; 175; 176; 177; 178; 179; 180; 181; 182; 183; 184; 185; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 197; 198; 200; 201; 204; 205; 206; 207; 208; 209; 210; 211; 212; 213; 214; 215; 216; 217; 218; 219; 220; 221; 222; 223; 224; 225; 226; 228; 229;
E	7.4+1.7+0.7	1.7	38; 40; 50; 55;
F	7.4+1.4+1.1	1.8	136; 137; 138; 139; 140; 141; 142; 143; 144; 145; 146; 147; 148
	7.4+1.3+0.9	1.5	127.4
	7.4+1.4	0.7	198.2

No total foram analisados 347 clones, sendo observado 8 tipos de restrições enzimáticas diferentes, dos quais já se tinham sequenciado alguns clones que codificavam para a proteína FE65.

3.6 Análise dos clones seleccionados por sequenciação

Foram então seleccionados vários clones para sequenciar. Nos clones em que a banda de 1.7 kb foi detectada a sequenciação pretendeu confirmar que os clones contêm cDNA que codifica para a

proteína FE65. Para os clones em que não se visualizou a banda de 1.7 kb e para os clones do grupo F que ainda não tinham sido sequenciados a sequenciação teve como objectivo determinar o cDNA presente. As sequências depois de obtidas foram visualizadas novamente com o programa Chromas1.45. Procuraram-se homologias na base de dados do GenBank com cada uma das sequências utilizando a ferramenta BLAST. Os clones sequenciados foram agrupados, Tabela 6

Tabela 6 – Tabela com todos os clones analisados por sequenciação. Os clones foram dispostos pelo grupo de restrição enzimática e por início do nucleótido em que começava a sequência. CU1 e CU2 identificam as colónias únicas de *E.coli* os clones que registaram duas digestões enzimáticas diferentes e uma não foi coincidente com nenhuma outra digestão.

Grupo de restrição	Identificação do Clone	Insert (kb)	Alinhamento do BLAST	Cromossoma	CDS	Início
A	80, 109,	2.7	Fe65 transcript var 1	11p15	101-2233	6
A'	108	2.7	Fe65 transcript var 1	11p15	101-2233	31
B	10	2.6	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	151
C	111, 240	2.1	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	616
D	103, 127.1, 133, 175, 198.1	1.9	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	813
E	55	1.7	Fe65 transcript var 1	11p15	101-2233	982
F	138, 142, 144, 146, 148	2.0	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	652
CU1	127.4	1.7	Fe65 transcript var 1 ou 2	11p15	101-2233	616
CU2	198.2	0.7	Piruvato cinase transcrip var 3	15q22	242-1837	1893

A sequenciação dos clones em que a banda de 1.7 kb foi detectada confirmou que estes clones contêm cDNA que codifica para a proteína FE65. O clone 108 que tinha uma restrição enzimática coincidente com a restrição do grupo A demonstrou codificar para a FE65 mas tendo um início de transcrição no nucleótido 31. Os clones que apresentavam bandas de 7.4, 1.4 e 1.1 kb, após o BLAST demonstraram conter cDNA que codifica para a proteína FE65 tendo início de transcrição no nucleótido 652. O plasmídeo extraído do clone

127 que apresentava uma restrição enzimática diferente, 127.4, tinha homologia com a FE65 mas tinha início no nucleótido 616. O plasmídeo do clone 198 que apresentava uma restrição enzimática diferente, 198.2, após o BLAST apresentou semelhança com o cDNA que codifica para a proteína piruvato cinase, mas fora da região que codifica para esta proteína.

3.6.1 Sequenciação dos clones 142 e 127

Os clones 142 e 127.4 demonstraram ter duas restrições enzimáticas diferentes mas ambas continham cDNA que codifica para a FE65. Foram então sequenciados novamente com o primer 3'AD amplimer de modo a possibilitar observar a parte final da sequência de cDNA do clone. As sequências foram depois visualizadas com o programa Chromas 1.45 e foi feito um alinhamento com sequências na base de dados do Genbank utilizando a ferramenta BLAST.

```

1441 catcagcatc cgcgtgtggg gcgctggggc ggacagtggg agagagaggg actttgccta
1501 cgtagctcgt gataagctga cccagatgct caagtgccac gtgtttcgct gtgaggcacc
1561 tgccaagaac atcgccacca gcoctgcatga gatctgctct aagatcatgg ccgaacggcg
1621 taatgccccg tgcttggtaa atggactctc cctggaccac tctaaacttg tggatgtccc
1681 tttccaagtg gaattcccag cgcctaagaa tgagtgtgtc cagaagttcc aagtctatta
1741 cctggggaat gtacctgttg ctaaacctgt tggggtagat gtgattaatg gggccctcga
1801 gtcagtctct tcctccagca gccgtgaaca atggacccca agtcatgtca gtgtggcccc
1861 ttgtaccctc accatcttgc accagcagac agaggcagtg ctgggagagt gtcgggtgcg
1921 tttcctctcc ttcctggcgg tgggcagaga tgtccacacg tttgcattca tcatggctgc
1981 cggcccagcc tccttctgct gccacatgtt ctggtgagag cccaatgctg ccagcctctc
2041 agaggctgtg caggctcgct gcatgcttcg ctaccagaag tgtctggatg cccgttccca
2101 ggctccacc tcctgctctc cagcaccctc tgctgagctc gtggcacggc gtgtaggggtg
2161 gactgtccgc aggggtgttc agtcgctgtg gggctccctg aagcccaaac ggctgggggc
2221 ccatacccca tgaagaagcc cccaccttcc ctccacctgc ttgtgttggg cccagggaa
2281 ctaaaggggtg tgggtcaggg aggggtctag aggctatttc taggcctcag gcctcccaaa
2341 tatgccctc ccagtagct acggttcct gcctaggagc tggggagga gagatcta
2401 cccttcaagg aagtgataac actggagtgg taacaagagg agcaggaagc aaggccagcc
2461 ctgggttctc atccccatgt gtttcaggtg gaacaggagg aactgggtcc ggccaggcct
2521 catcctcctg gacccagcag gggcagaagg aggaagggac tgggtccaggc atgggtccct
2581 tccccctgct ccatgggcac ctctgctgta ttgatatcac taataaagtc tgtctgcact
2641 gcaaaaaaaaa aaa

```

Codão STOP

Figura 12 – Final da sequência de cDNA que codifica para a proteína FE65. Marcado a amarelo encontram-se os nucleótidos que não se encontram no clone 142. O codão de STOP inicia-se no nucleótido 2231.

Após a sequenciação verificou-se que o clone 142 apresentava uma análise de restrição diferente porque não continha 409 nucleótidos

na parte final, Figura 12. No entanto o clone contém o codão de STOP, codificando a parte final da proteína correctamente, formando a proteína FE65 na totalidade.

O clone 142 tinha registado uma restrição enzimática semelhante a vários outros clones, grupo F. Deste grupo de clones apenas o clone 147 foi sequenciado com o primer 3'AD amplimer.

```

1441 catcagcattc cgcgtgtggg ggcgtggggc ggacagtgga agagagaggg actttgccta
1501 cgtagctcgt gataagctga cccagatgct caagtgccac gtgtttcgct gtgaggcacc
1561 tgccaagaac atcgccacca gcctgcatga gatctgctct aagatcatgg ccgaacggcg
1621 taatgcccg cgtttggtaa atggactctc cctggaccac tctaaacttg tggatgtccc
1681 tttccaagtg gaattcccag cgcctaagaa tgagtgggtc cagaagtcc aagtcatta
1741 cctggggaat gtacctgttg ctaaacctgt tgggtagat gtgattaatg gggccctcga
1801 gtcagtctct tcctccagca gccgtgaaca atggaccca agtcattgca gtgtggcccc
1861 tgctacctc accatcttg accagcagac agaggcagtg ctgggagagt gtcgggtgcg
1921 tttcctctc tcctggccg tgggcagaga tgtccacacg ttgcatcca tcatggctgc
1981 cggcccagcc tccttctgct gccacatgtt ctggtgagag cccaatgtg ccagcctctc
2041 agaggctgtg caggctgctg gcatgcttgc ctaccagaag tgtctggatg cccgttccca
2101 ggctccacc tcctgcctcc cagcaccccc tgctgagtct gtggcacggc gtgtagggtg
2161 gactgtccgc aggggtgttc agtcgctgtg gggctccctg aagcccaaac ggctgggggc
2221 ccatacccca tgagaagcc cccaccttcc ctccacctgc ttgtgttggg ccccagggaa
2281 ctaaaggggtg tgggtcaggg aggggtctag aggcatttcc taggcctcag gcctcccaaa
2341 tatgcccctc cccagtagct acggttcctt gcctaggagc tggggagggg gagatctaatt
2401 cccttcaagg aagtgataac actggagtgg taacaagagg agcagggaag aaggccagcc
2461 ctggttcttc atccccatgt gtttcagggtg gaacaggagg aactgggtcca ggccaggcct
2521 catcctctg gacccagcag gggcagaagg aggaaggagc tgggtccaggc atgggtccct
2581 tccccctgct ccatgggcac ctctgctgta ttgatatac taataaagtc tgtctgcact
2641 gcaaaaaaaaa aaa
  
```

Codão de STOP

Figura 13 – Final da sequência de cDNA que codifica para a proteína FE65. Marcados a amarelo encontram-se os nucleótidos que não estão presentes no plasmídeo que apresentou uma digestão enzimática diferente, 127.4. O codão de STOP inicia-se no nucleótido 2231.

O plasmídeo do clone 127 onde se visualizou uma digestão enzimática diferente de todas as digestões observadas até esta fase, 127.4, apresentou uma sequenciação um pouco diferente, pois possuía um cDNA com menos 473 nucleótidos na parte final, Figura 13, que incluem o codão de STOP. Contudo a proteína de fusão codificada pelo clone 127.4 tem o domínio de interacção com a APP, o PTB2, intacto. Como o codão STOP não está presente, a transcrição/tradução deste cDNA continua até ao primeiro codão STOP no vector pACT2. A proteína final deduzida pela sequência de cDNA é diferente, mas no entanto, os

domínios PTB não foram afectados e podem ser transcritos sem qualquer modificação.

Este clone que mesmo assim possui os domínios PTB da proteína FE65 é único, justificado pelo facto de não ter sido encontrado mais nenhum clone com uma restrição enzimática que apresente bandas com estas características.

4 Discussão

4.1 Detecção de interacções com o AICD pelo método dois híbrido

O rastreio em larga escala do método dois híbrido em levedura originou 347 clones positivos, confirmando ser um método bastante eficiente na detecção de interacções de proteínas, sendo neste caso específico, aquelas que interagem com o AICD.

Após a extracção do DNA plasmídico de bactéria e sequenciação os clones analisados apresentam codificar para a proteína FE65 e contêm a região que codifica para o domínio PTB2, que é o domínio que interage com o AICD. Esta é uma interacção já largamente descrita. Ao detectar-se esta interacção pode-se verificar que o método Dois-híbrido em levedura é um método específico, sendo um método válido para detectar interacções de proteínas.

As sequenciações demonstraram que nenhum cDNA estava em grelha com o Gal4-AD de modo a que a proteína FE65 seja traduzida correctamente. Este facto pode ser explicado pelo facto de as leveduras terem a capacidade de fazer "frame-shift", sintetizando a sequência de aminoácidos correcta de modo a produzir uma proteína de fusão que promove a sobrevivência no meio selectivo – mecanismo de "recoding".

O isolamento de dois plasmídeos de biblioteca diferentes de um único clone ocorreu por duas vezes, nos clones 127 e 198. Ao fazer-se a transformação da biblioteca, a levedura pode ocasionalmente adquirir mais que um plasmídeo. O clone 127 continha dois plasmídeos de biblioteca que codificam para a FE65, o 127.1 (grupo D) e o 127.4. O cDNA do plasmídeo 127.4 apresentou a digestão com HindIII diferente devido à deleção de 409 de nucleótidos não sendo necessária a

confirmação que a interacção se deva à presença do plasmídeo. No outro caso, o clone 198, também continha dois plasmídeos de biblioteca diferentes. O plasmídeo 198.1 codifica para a proteína FE65 e o plasmídeo 198.2 corresponde à sequência não codificante do mRNA da proteína Piruvato cinase. Neste caso a interacção positiva detectada pelo crescimento das células de levedura em meio selectivo e pela cor azul, dever-se-há à presença do cDNA da FE65 (plasmídeo 198.1).

4.1.1 A FE65 formada pelo clone 127.4

O clone 127 apresentou duas digestões enzimáticas diferentes. Após a sequenciação verificou-se que o cDNA 127.4 codificava para uma proteína muito semelhante à FE65 mas não possuía alguns nucleótidos que estão presentes nos transcritos na base de dados GenBank. Este cDNA de biblioteca não possuía 473 nucleótidos, dando origem a uma proteína truncada no C-terminal, resultando numa sequência de aminoácidos distinta da FE65, Figura 14.

>FE65 – NM_001164

```

M SVPSSLSQSAINANSHGGPALSPLPLHAAHNQL
LNAKLQATAVGPKDLRSAMGEGGGPEPGPANAKW
LKEGQNQLRRAATAHRDQNRNVTTLTAAEEASQEPE
MAPLGPKGGLIHLHYSELELSAHNAANRGLRGPGLIIS
TQEQGPDEGEEKAAAGEAEEEEEDDDDEEEEEEDLS
SPPGLPEPLESVEAPPRPQALTDGPREHSKSASLL
FGMRNSAASDEDSSWATLSQGSPSYGSPEDTDSF
WNPNAFETDSDLPAGWMRVQDTSGTYYWHIPTGT
TQWEPPGRASPSQGSSPQEESSQLTWTGFAHGEGF
EDGEFWKDEPSDEAPMELGLKEPEEGTLTFPAQSL
SPEPLPQEEELKPPRNTNPGIKCFAVRSLGWVEMT
EEELAPGRSSVAVNNCIRQLSYHKNNLHDPMSGG
WGEKDLLLQLEDETLKLVEPQSQALLHAQPIISIR
VWGVGRDSGRERDFAYVARDKLTQMLKCHVFRCE
APAKNIATSLHEICSKIMAERRNARCLVNGLSLDHS
KLVDVPFQVEFPAPKNELVQKFQVYYLGNVPVAKP
VGVDVINGALESVLSSSSREQWTPSHVSVAPATLT
ILHQQTEAVLGEICRVRFSLFLAVGRDVHTFAFIMAA
GPASFCCHMFWCEPNAASLSEAVQAACMLRYQKC
LDARSQASTSCLPAPPAESVARRVGWTVRRGVQS
LWGS LKPKRLGAHTP

```

>FE65 – clone 127.4

```

M SVPSSLSQSAINANSHGGPALSPLPLHAAHNQL
LNAKLQATAVGPKDLRSAMGEGGGPEPGPANAKW
LKEGQNQLRRAATAHRDQNRNVTTLTAAEEASQEPE
MAPLGPKGGLIHLHYSELELSAHNAANRGLRGPGLIIS
TQEQGPDEGEEKAAAGEAEEEEEDDDDEEEEEEDLS
SPPGLPEPLESVEAPPRPQALTDGPREHSKSASLL
FGMRNSAASDEDSSWATLSQGSPSYGSPEDTDSF
WNPNAFETDSDLPAGWMRVQDTSGTYYWHIPTGT
TQWEPPGRASPSQGSSPQEESSQLTWTGFAHGEGF
EDGEFWKDEPSDEAPMELGLKEPEEGTLTFPAQSL
SPEPLPQEEELKPPRNTNPGIKCFAVRSLGWVEMT
EEELAPGRSSVAVNNCIRQLSYHKNNLHDPMSGG
WGEKDLLLQLEDETLKLVEPQSQALLHAQPIISIR
VWGVGRDSGRERDFAYVARDKLTQMLKCHVFRCE
APAKNIATSLHEICSKIMAERRNARCLVNGLSLDHS
KLVDVPFQVEFPAPKNELVQKFQVYYLGNVPVAKP
VGVDVINGALESVLSSSSREQWTPSHVSVAPATLT
ILHQQTEAVLGEICRVRFSLFLAVGRDVHTFAFIMAA
GPASFCCHMFWCEPNAASLSEAVQAACMLRYQKC
LDARSQASTSCLPAPPAVLISLIKSVCTAKKKKKKK
KKKKKKKKKKPREIYES

```

Figura 14 – Diferença entra a proteína FE65 do GeneBank e a proteína codificada pelo clone 127.4.

Esta sequência é diferente apenas no C-terminal, mantendo o domínio PTB2 inalterado. A deleção destes 473 nucleótidos pode ter ocorrido na preparação da biblioteca de cDNA, quando o cDNA foi digerido com EcoRI e XhoI para ser inserido no plasmídeo pACT2.

4.2 Interação do AICD com a FE65

Esta interação foi inicialmente descrita por Fiore *et al.* (1995) [116], em que utilizou o método Dois-híbrido em levedura, mas a proteína FE65 foi utilizada como isco. Após o rastreio foi registada a interação com várias proteínas, nas quais se encontrava o AICD. Posteriormente, esta interação foi amplamente estudada e descrita, e o domínio PTB2 da FE65 foi identificado como o domínio que estabelece a interação com o AICD no motivo ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ [80]. A FE65 consegue interagir com o AICD porque o domínio PTB2 da FE65 reconhece a tirosina⁶⁸² e a tirosina⁶⁸⁷. Porém, a treonina⁶⁶⁸ pode influenciar a ligação com outras proteínas de acordo com o estado de fosforilação, Figura 15. Se a treonina⁶⁶⁸ estiver fosforilada pode modificar a conformação da proteína entre *cis* e *trans* mudando assim a afinidade entre as proteínas [80].

Os resultados apresentados demonstram que a FE65 pode interagir com o AICD não sendo necessário qualquer modificação no AICD para a ligação se estabelecer, estando o AICD na forma nativa.

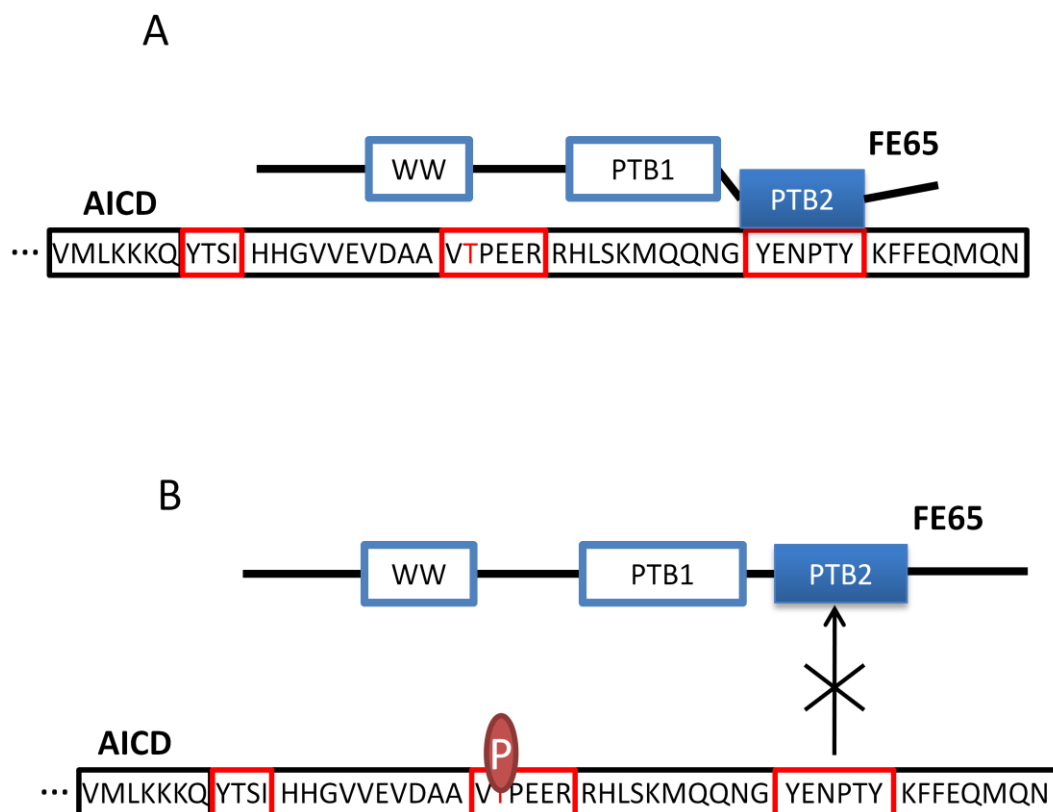


Figura 15 – Representação esquemática da capacidade de ligação da FE65 com o AICD. (A) A proteína FE65 interage facilmente com o AICD quando a tirosina⁶⁶⁸ não está fosforilada. (B) Ao ocorrer a fosforilação da treonina⁶⁶⁸ a afinidade de ligação com a FE65 diminui drasticamente.

4.2.1 Funções do complexo AICD\FE65

A FE65 é uma proteína expressa em tecidos nervosos, particularmente no hipocampo e isocórtex. A FE65 é conhecida como uma proteína que está presente no núcleo das células e este facto em conjunto com outros factores [78-79] aponta para que a FE65 desempenhe um papel na transcrição. Esta informação é sustentada pelo facto de a FE65 se ligar a factores de transcrição, como o CP2\LSF\LBP1 [81].

Os genes que o complexo AICD/FE65 pode transcrever são os das proteínas KAI1, timidina sintetase, GSK-3 β , APP, BACE1, neprilisina e Tip60 [79, 86, 117-120].

O GSK-3 é uma cinase que regula o metabolismo do glicogénio, regula a apoptose, é responsável pela fosforilação da proteína tau [121] e modula a produção de A β . Em ratos transgénicos a isoforma GSK-3 β está associada à anormal hiperfosforilação da proteína tau [122] e estudos demonstram que a sobre expressão da GSK-3 β promove a apoptose neuronal [123]. A KAI1 é uma molécula de superfície celular que age como um supressor de metástase tumoral. Tem um papel preponderante na adesão celular e é capaz de interagir com vários receptores da membrana plasmática [124]. A timidina sintetase é uma enzima essencial para a síntese de ácido timidílico [125], um precursor nuclear para a replicação e reparação do DNA. A inibição da actividade da timidina sintetase causa a paragem do crescimento celular ou apoptose [126]. A neprilisina é uma metalopeptidase que é expressa normalmente em tecidos como o tecido cerebral. A neprilisina está envolvida na regulação dos níveis de A β [127]. Estudos *in vitro* demonstram que a neprilisina pode clivar o A β entre os resíduos glutamato3 – fenilalanina4, glicina9 – triptofano10, fenilalanina19 – fenilalanina20, alanina30 – isoleucina31, e glicina33 – leucina34 [128]. Estudos *in vivo* confirmam que a neprilisina pode degradar o A β endógeno administrado a cérebro em ratinhos [129].

Os genes que o complexo pode transcrever têm distintas funções, podendo o complexo FE65/AICD ter um papel preponderante nos genes transcritos e da influência destes na doença de Alzheimer. Por estudos realizados com ratos transgénicos, verificou-se que a sobre expressão da proteína FE65 diminui os níveis de A β [130], dado que divergem de outros estudos [131]. Foi também descrito que o nível de expressão da FE65 no córtex frontal e temporal diminui em doentes que apresentaram a doença de Alzheimer [132] associando neste casos a baixa expressão da FE65 à causa/consequência da doença. A alteração dos genes expressos pode ocorrer como resposta geral à lesão nos neurónios ou a estímulos externos.

4.3 O AICD na forma nativa interage predominantemente com a FE65

Algumas interacções conhecidas do AICD são efectuadas com proteínas que possuem pelo menos um domínio de ligação a fosfotirosinas. Regularmente, estes domínios interagem com tirosinas fosforiladas, através de aminoácidos que reconhecem as cargas do fosfato [133]. No entanto, Zambrano *et al* [134] demonstraram que a FE65 era uma proteína que continha dois domínios PTB mas apenas interagia com o AICD no segundo domínio de ligação, PTB2. Através de GST “pull-down” verificaram que a APP não interagia como o domínio PTB1 da FE65 nem no domínio PTB da ShcA. As interacções do AICD com proteínas que possuem domínios PTB não são realizadas enquanto o motivo ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ do AICD não estiver fosforilado [135]. No entanto, a FE65 e outras proteínas duas que se ligam ao AICD, por exemplo a X11α e a mDab-1, possuem domínios de interacção PTB que não necessitam que o motivo ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ esteja fosforilado [91, 136-138]. Contudo estas interacções ainda não estão bem esclarecidas.

O rastreio realizado com o AICD50 apenas apresentou interacções com a FE65. A fosforilação de tirosinas da APP pode regular as interacções com outras proteínas e associar o AICD a vias de apoptose ou a vias de proliferação/diferenciação.

Foi descrito que os níveis de expressão de X11α e X11β aumentam em cérebros de *postmortem* de doentes que manifestavam a doença de Alzheimer [139]. A biblioteca de cDNA com a qual foi realizado o rastreio era proveniente de cérebro humano sem registo de doenças neurológicas, o nível de X11α e X11β pode não ser suficientemente alto de modo a ser mascarada pela FE65, o que explica a frequência elevada de clones de FE65 no rastreio realizado. Estudos realizados em ratinhos demonstram que a interacção mais frequente

que o AICD estabelece é com a FE65 [140] de modo que esta interacção do AICD pode ser de tal forma intensa de modo a não permitir a visualização da interacção com outras proteínas.

Tabela 7 – Dados de rastreios de Dois-híbrido efectuados anteriormente no laboratório simulando a fosforilação na tirosina⁶⁸⁷ [141].

	Total	FE65	% FE65
AICD-WT	347	347	100
AICD Y687E	55	0	0
AICD Y687F	88	56	63,6

Ao comparar os resultados com outros resultados obtidos anteriormente no laboratório, Tabela 7, pode-se verificar que ao substituir-se a tirosina⁶⁸⁷ por outro aminoácido a percentagem de interacções do AICD com a FE65 diminui [141]. No entanto não se verificam quais quer interacções entre o AICD e a FE65 quando se simula a fosforilação da tirosina⁶⁸⁷, observando que a fosforilação do AICD inibe a interacção com a FE65. Estudos já realizados demonstram que o nível de fosforilação da treonina⁶⁶⁸ aumenta em casos de Alzheimer [110]. Zhou *et al.*[135] descreve que a fosforilação da tirosina⁶⁸² é prejudicial à interacção do AICD com a FE65. Surge assim a ideia que qualquer modificação nos aminoácidos do AICD causa uma variação na interacção do AICD com a FE65.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se confirmar que a interacção da FE65 com o AICD em condições nativas é a interacção mais recorrente que o AICD pode estabelecer, sendo que a sua alteração pode ser uma consequência ou uma causa relativa à doença de Alzheimer.

4.4 A FE65 e a doença de Alzheimer

A FE65 está directamente envolvida na formação de complexos que têm funções ainda não muito claras, que incluem a transcrição de genes envolvidos na sinalização celular, processamento de proteínas e mobilidade celular. O papel da FE65 na doença de Alzheimer ainda não está totalmente esclarecido, podendo ter efeitos na produção de A β . Todas as actividades dos genes transcritos estão de alguma forma relacionadas com a APP, e algumas estão inter-relacionadas entre si.

A variação no nível de expressão da FE65, da APP, da X11 α e

Tabela 8- Variação da expressão da FE65, APP e X11 α e X11 β em cérebros de pacientes que manifestavam a doença de Alzheimer em relação a pessoas que não registavam qualquer doença neurológica em diferentes tecidos. nnFE65 – FE65 não neuronal; nFE65 – FE65 neuronal.

Zona do cérebro	Proteína	Variação do mRNA	Autor
Córtex frontal e temporal	nnFE65	↑	Hu <i>et al.</i> 2000 [132]
Córtex frontal e temporal	nFE65	↓	Hu <i>et al.</i> 2000 [132]
Córtex Parietal	X11 α X11 β	↑	Jacobs <i>et al.</i> 2006 [139]
Córtex Temporal	APP ₇₅₁ APP ₇₇₀	↑	Matsui <i>et al.</i> 2007 [142]
Córtex Temporal	APP ₆₉₅	↓	Matsui <i>et al.</i> 2007 [142]
Hipocampo e Córtex	APP ₆₉₅	↓	Johnson <i>et al.</i> 1988 [143]
Hipocampo e Córtex	APP ₆₉₅	↓	Spilantini <i>et al.</i> 1989 [144]
Hipocampo	APP ₆₉₅ APP ₇₅₁	=	Hyman <i>et al.</i> 1993 [145]

X11 β pode-se relacionar com a doença de Alzheimer. Estudos em cérebros *postmortem* de doentes de Alzheimer revelaram que o nível de expressão da forma neuronal da FE65 tem tendência a diminuir enquanto a forma não neuronal da FE65 tem tendência a aumentar [132]. A translocação da FE65 para o núcleo requer a clivagem do AICD [146], potenciando o aumento da quantidade de A β . A diminuição da APP₆₉₅ [142-143] e da forma neuronal da FE65 pode ser uma forma de evitar a produção de A β . Esta ideia é reforçada com os dados da expressão das X11 α e X11 β [139] que têm tendência a aumentar, de modo a diminuir a clivagem da APP.

No que diz respeito à APP total, o seu nível de expressão mantém-se. No entanto a razão entre as isoformas que contêm o domínio inibidor de proteases Kunitz (APP+KPI) e a isoforma APP₆₉₅, (APP+KPI / APP₆₉₅) aumenta [142-144]. A diminuição da expressão da isoforma APP₆₉₅ pode sugerir uma forma do neurónio diminuir a quantidade de A β intracelular. Contudo estudos realizados demonstram que as isoformas da APP que contêm o domínio KPI têm maior tendência para originar A β que a isoforma APP₆₉₅ [147].

Os níveis, bem como a interacção, da FE65 e do AICD são muito modificados em casos que manifestam a doença de Alzheimer manifestando alterações proteicas que podem ter importantes papéis na doença. Assim, esta é uma interacção importante a estudar e aprofundar conhecimentos, principalmente no que diz respeito à variação dos genes expressos.

Após a finalização deste trabalho podem-se retirar várias conclusões em relação à metodologia usada e resultados obtidos:

1. Por se ter identificado uma proteína que interage com a proteína isco que já estava descrita, verifica-se que o método Dois-híbrido em levedura é um método válido para a identificação de interacções de proteínas;

2. A identificação de uma sequência de cDNA que não codifica para nenhuma proteína, pode indicar um falso positivo. A presença de apenas um falso positivo entre 347 possíveis positivos identificados confere ao método uma elevada fiabilidade;
3. O AICD quando se encontra na forma nativa interage preferencialmente com a proteína FE65. Quando o AICD sofre fosforilações esta interacção é afectada podendo ser inibida.

5 Bibliografia

1. Organization, W.H. *Mental Health and Substance Abuse*. 2010; Available from: http://www.searo.who.int/en/Section1174/Section1199/Section1567/Section1823_8066.htm.
2. Berchtold, N.C. and Cotman, C.W., *Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s*. *Neurobiology of Aging*, 1998. **19**(3): p. 173-189.
3. Locascio, J.J., Growdon, J.H., and Corkin, S., *Cognitive Test Performance in Detecting, Staging, and Tracking Alzheimer's Disease*. *Archives of Neurology*, 1995. **52**(11): p. 1087-1099.
4. Moore, V. and Wyke, M.A., *Drawing disability in patients with senile dementia*. *Psychological Medicine*, 1984. **14**(01): p. 97-105.
5. Beatty, W.W., Salmon, D.P., Butters, N., Heindel, W.C., and Granholm, E.L., *Retrograde amnesia in patients with Alzheimer's disease or Huntington's disease*. *Neurobiology of Aging*, 1988. **9**: p. 181-186.
6. Cummings, J.L., Houlihan, J.P., and Hill, M.A., *The pattern of reading deterioration in dementia of the Alzheimer type: Observations and implications*. *Brain and Language*, 1986. **29**(2): p. 315-323.
7. Haupt, M. and Kurz, A., *Predictors of nursing home placement in patients with alzheimer's disease*. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 1993. **8**(9): p. 741-746.
8. Neils, J., Boller, F., Gerdeman, B., and Cole, M., *Descriptive writing abilities in Alzheimer's disease*. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 1989. **11**(5): p. 692-698.
9. Förstl, H. and Kurz, A., *Clinical features of Alzheimer's disease*. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 1999. **249**(6): p. 288-290.
10. Wenk, G.L., *Neuropathologic changes in Alzheimer's disease*. 2003, Memphis, TN, ETATS-UNIS: Physicians Postgraduate Press. 4.
11. Tanzi, R.E. and Bertram, L., *Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective*. *Cell*, 2005. **120**(4): p. 545-555.
12. Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V., and Eanes, E.D., *The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis*. *Appl Pathol*, 1984. **2**(6): p. 357-69.
13. Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B., *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. *Nature*, 1987. **325**(6106): p. 733-736.
14. Hardy, J. and Allsop, D., *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1991. **12**: p. 383-388.
15. Blanquet, V., Goldgaber, D., Turleau, C., Creau-Goldberg, N., Delabar, J., Sinet, P.M., Roudier, M., and de Grouchy, J., *The beta amyloid protein (AD-AP) cDNA hybridizes in normal and Alzheimer individuals near the interface of 21q21 and q22.1*. *Ann Genet*, 1987. **30**(2): p. 68-9.
16. Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D.C., *Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease*. *Science*, 1987. **235**(4791): p. 877-880.
17. Jenkins, E.C., Devine-Gage, E.A., Robakis, N.K., Yao, X.-L., Brown, W.T., Houck, G.E., Wolfe, G., Ramakrishna, N., Silverman, W.P., and Wisniewski, H.M.,

- Fine mapping of an Alzheimer Disease-associated gene encoding beta-amyloid protein.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988. **151**(1): p. 1-8.
18. Korenberg, J.R., Pulst, S.-M., Neve, R.L., and West, R., *The Alzheimer amyloid precursor protein maps to human chromosome 21 bands q21.105-q21.05.* Genomics, 1989. **5**(1): p. 124-127.
19. Patterson, D., Gardiner, K., Kao, F.T., Tanzi, R., Watkins, P., and Gusella, J.F., *Mapping of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein and its relationship to the Down syndrome region of chromosome 21.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(21): p. 8266-8270.
20. Robakis, N.K., Ramakrishna, N., Wolfe, G., and Wisniewski, H.M., *Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(12): p. 4190-4194.
21. da Cruz e Silva, E.F. and da Cruz e Silva, O.A.B., *Protein Phosphorylation and APP Metabolism.* Neurochemical Research, 2003. **28**(10): p. 1553-1561.
22. Ling, Y., Morgan, K., and Kalsheker, N., *Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003. **35**(11): p. 1505-1535.
23. Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., and Abraham, W.C., *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory.* Progress in Neurobiology, 2003. **70**(1): p. 1-32.
24. Selkoe, D.J., Podlisny, M.B., Joachim, C.L., Vickers, E.A., Lee, G., Fritz, L.C., and Oltersdorf, T., *Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(19): p. 7341-7345.
25. Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Nakamura, S., and Ueda, K., *Tissue-specific expression of three types of [beta]-protein precursor mRNA: Enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989. **165**(3): p. 1406-1414.
26. Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J., *Targeting of cell-surface [beta]-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments.* Nature, 1992. **357**(6378): p. 500-503.
27. Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dirksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L., and Beyreuther, K., *Localization of Alzheimer [beta]A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites.* Brain Research, 1991. **563**(1-2): p. 184-194.
28. Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H.-P., Wolfer, D.P., and Muller, U., *Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members.* Journal of Neuroscience, 2000. **20**(21): p. 7951-7963.
29. von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H.T., Price, D.L., and Sisodia, S.S., *Generation of APLP2 KO Mice and*

- Early Postnatal Lethality in APLP2/APP Double KO Mice*. *Neurobiology of Aging*, 1997. **18**(6): p. 661-669.
30. Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., and Nishimoto, I., *Ligand-dependent G Protein Coupling Function of Amyloid Transmembrane Precursor*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(9): p. 4205-4208.
 31. Carter, B.D. and Medzihradsky, F., *Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. **90**(9): p. 4062-4066.
 32. Moriarty, T.M., Padrell, E., Carty, D.J., Omri, G., Landau, E.M., and Iyengar, R., *Go protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway*. *Nature*, 1990. **343**(6253): p. 79-82.
 33. Breen, K.C., Bruce, M., and Anderton, B.H., *Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion*. *Journal of Neuroscience Research*, 1991. **28**(1): p. 90-100.
 34. Chen, M. and Yankner, B.A., *An antibody to [beta] amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types*. *Neuroscience Letters*, 1991. **125**(2): p. 223-226.
 35. Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., and Greengard, P., *The Alzheimer Amyloid Precursor Protein (APP) and Fe65, an APP-Binding Protein, Regulate Cell Movement*. *The Journal of Cell Biology*, 2001. **153**(7): p. 1403-1414.
 36. Mok, S.S., Sberna, G., Heffernan, D., Cappai, R., Galatis, D., Clarris, H.J., Sawyer, W.H., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Small, D.H., *Expression and analysis of heparin-binding regions of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease*. *FEBS Letters*, 1997. **415**(3): p. 303-307.
 37. Beher, D., Hesse, L., Masters, C.L., and Multhaup, G., *Regulation of Amyloid Protein Precursor (APP) Binding to Collagen and Mapping of the Binding Sites on APP and Collagen Type I*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(3): p. 1613-1620.
 38. Kibbey, M.C., Jucker, M., Weeks, B.S., Neve, R.L., Van Nostrand, W.E., and Kleinman, H.K., *beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. **90**(21): p. 10150-10153.
 39. Storey, E., Beyreuther, K., and Masters, C.L., *Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components*. *Brain Research*, 1996. **735**(2): p. 217-231.
 40. Annaert, W.G., Esselens, C., Baert, V., Boeve, C., Snellings, G., Cupers, P., Craessaerts, K., and De Strooper, B., *Interaction with Telencephalin and the Amyloid Precursor Protein Predicts a Ring Structure for Presenilins*. *Neuron*, 2001. **32**(4): p. 579-589.
 41. Storey, E., Katz, M., Brickman, Y., Beyreuther, K., and Masters, C.L., *Amyloid precursor protein of Alzheimer's disease: evidence for a stable, full-length, trans-membrane pool in primary neuronal cultures*. *European Journal of Neuroscience*, 1999. **11**(5): p. 1779-1788.
 42. Buxbaum, J.D., Thinakaran, G., Koliatsos, V., O'Callahan, J., Slunt, H.H., Price, D.L., and Sisodia, S.S., *Alzheimer Amyloid Protein Precursor in the Rat Hippocampus: Transport and Processing through the Perforant Path*. *Journal of Neuroscience*, 1998. **18**(23): p. 9629-9637.

43. Sisodia, S.S., Koo, E.H., Hoffman, P.N., Perry, G., and Price, D.L., *Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system*. Journal of Neuroscience, 1993. **13**(7): p. 3136-3142.
44. Mucke, L., Masliah, E., Johnson, W.B., Ruppe, M.D., Alford, M., Rockenstein, E.M., Forss-Petter, S., Pietropaolo, M., Mallory, M., and Abraham, C.R., *Synaptotrophic effects of human amyloid [beta] protein precursors in the cortex of transgenic mice*. Brain Research, 1994. **666**(2): p. 151-167.
45. Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Van Der Ploeg, L.H.T., and Sirinathsinghji, D.J.S., *Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the [beta]-amyloid precursor protein*. Neuroscience, 1999. **90**(1): p. 1-13.
46. Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S.J., Creemers, J., Seidah, N., and Checler, F., *Constitutive alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10*. Journal of Neurochemistry, 2001. **76**(5): p. 1532-1539.
47. Seabrook, G.R., Smith, D.W., Bowery, B.J., Easter, A., Reynolds, T., Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Zheng, H., Dawson, G.R., Sirinathsinghji, D.J.S., Davies, C.H., Collingridge, G.L., and Hill, R.G., *Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein*. Neuropharmacology, 1999. **38**(3): p. 349-359.
48. Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R.M., Lenardo, M.J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D'Adamio, L., *Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor*. J Alzheimers Dis, 2000. **2**(3-4): p. 289-301.
49. Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J., and Younkin, S.G., *Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives*. Science, 1992. **255**(5045): p. 728-730.
50. Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., and Fahrenholz, F., *Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases*. The FASEB Journal, 2001: p. 01-0007fje.
51. Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P., and Blobel, C.P., *Metalloprotease-Disintegrin MDC9: Intracellular Maturation and Catalytic Activity*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(6): p. 3531-3540.
52. Schlöndorff, J., Becherer, J.D., and Blobel, C.P., *Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE)*. Biochemical Journal, 2000. **347**(1): p. 131-138.
53. Buxbaum, J.D., Liu, K.-N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A., *Evidence That Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme Is Involved in Regulated α -Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(43): p. 27765-27767.
54. Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J.,

- March, C.J., and Cerretti, D.P., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-[alpha] from cells*. *Nature*, 1997. **385**(6618): p. 729-733.
55. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F., *Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(7): p. 3922-3927.
 56. Kuentzel, S.L., Ali, S.M., Altman, R.A., Greenberg, B.D., and Raub, T.J., *The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells*. *Biochem J*, 1993. **295** (Pt 2)(Pt 2): p. 367-78.
 57. Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, L., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M., *beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. *Science*, 1999. **286**(5440): p. 735-741.
 58. Hardy, J., *Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved?* *Curr Alzheimer Res*, 2006. **3**(1): p. 71-3.
 59. Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.-C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R., *Expression Analysis of BACE2 in Brain and Peripheral Tissues*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(27): p. 20647-20651.
 60. Bennett, B.D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D.B., Kahn, S., Louis, J.-C., Citron, M., and Vassar, R., *A Furin-like Convertase Mediates Propeptide Cleavage of BACE, the Alzheimer's β -Secretase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(48): p. 37712-37717.
 61. Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C., *Maturation and Pro-peptide Cleavage of β -Secretase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(40): p. 30849-30854.
 62. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., and Wong, P.C., *BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons*. *Nat Neurosci*, 2001. **4**(3): p. 233-4.
 63. Huse, J.T., Liu, K., Pijak, D.S., Carlin, D., Lee, V.M.Y., and Doms, R.W., *β -Secretase Processing in the Trans-Golgi Network Preferentially Generates Truncated Amyloid Species That Accumulate in Alzheimer's Disease Brain*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(18): p. 16278-16284.
 64. Fluhner, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condron, M.M., Teplow, D.B., Haass, C., and Walter, J., *A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway*. *Journal of Neurochemistry*, 2002. **81**(5): p. 1011-1020.
 65. Sisodia, S.S., *Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. **89**(13): p. 6075-6079.
 66. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C., *Reconstitution of [gamma]-secretase activity*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(5): p. 486-488.
 67. Krishnaswamy, S., Verdile, G., Groth, D., Kanyenda, L., and Martins, R.N., *The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex*. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2009. **46**(5-6): p. 282-301.

68. Marks, N. and Berg, M., *BACE and γ -Secretase Characterization and Their Sorting as Therapeutic Targets to Reduce Amyloidogenesis*. Neurochemical Research, 2010. **35**(2): p. 181-210.
69. Selkoe, D.J., *Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy*. Physiological Reviews, 2001. **81**(2): p. 741-766.
70. Bertrand, E., Brouillet, E., Caillé, I., Bouillot, C., Cole, G.M., Prochiantz, A., and Allinquant, B., *A Short Cytoplasmic Domain of the Amyloid Precursor Protein Induces Apoptosis In Vitro and In Vivo*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2001. **18**(5): p. 503-511.
71. Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H.T., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S., and Nicholson, D.W., *Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid-[beta] Precursor Protein and Amyloidogenic A[beta] Peptide Formation*. Cell, 1999. **97**(3): p. 395-406.
72. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M.M., Teplow, D.B., and Haass, C., *Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein*. EMBO Rep, 2001. **2**(9): p. 835-41.
73. Müller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K., *The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics--Relevance for Alzheimer's disease*. Progress in Neurobiology, 2008. **85**(4): p. 393-406.
74. Ando, K., Iijima, K.-i., Elliott, J.I., Kirino, Y., and Suzuki, T., *Phosphorylation-dependent Regulation of the Interaction of Amyloid Precursor Protein with Fe65 Affects the Production of β -Amyloid*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(43): p. 40353-40361.
75. Ramelot, T.A. and Nicholson, L.K., *Phosphorylation-induced structural changes in the amyloid precursor protein cytoplasmic tail detected by NMR*. Journal of Molecular Biology, 2001. **307**(3): p. 871-884.
76. Duilio, A., Faraonio, R., Minopoli, G., Zambrano, N., and Russo, T., *Fe65L2: a new member of the Fe65 protein family interacting with the intracellular domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein*. Biochemical Journal, 1998. **330**(1): p. 513-519.
77. Hu, Q., Wang, L., Yang, Z., Cool, B.H., Zitnik, G., and Martin, G.M., *Endoproteolytic cleavage of FE65 converts the adaptor protein to a potent suppressor of the sAPP α pathway in primates*. Vol. 280. 2005, Bethesda, MD, ETATS-UNIS: American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 11.
78. Cao, X. and Sudhof, T.C., *A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60*. Science, 2001. **293**(5527): p. 115-20.
79. von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., and Konietzko, U., *The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(19): p. 4435-4448.
80. Radzimanowski, J., Simon, B., Sattler, M., Beyreuther, K., Sinning, I., and Wild, K., *Structure of the intracellular domain of the amyloid precursor protein in complex with Fe65-PTB2*. EMBO Rep, 2008. **9**(11): p. 1134-40.
81. McLoughlin, D.M. and Miller, C.C.J., *The FE65 proteins and Alzheimer's disease*. Journal of Neuroscience Research, 2008. **86**(4): p. 744-754.

82. Nakaya, T. and Suzuki, T., *Role of APP phosphorylation in FE65-dependent gene transactivation mediated by AICD*. *Genes to Cells*, 2006. **11**(6): p. 633-645.
83. Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N., and Russo, T., *The β -Amyloid Precursor Protein Functions as a Cytosolic Anchoring Site That Prevents Fe65 Nuclear Translocation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(9): p. 6545-6550.
84. Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y., *Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis*. *Cell*, 2000. **102**(4): p. 463-73.
85. Sapountzi, V., Logan, I.R., and Robson, C.N., *Cellular functions of TIP60*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006. **38**(9): p. 1496-1509.
86. Kim, H.S., Kim, E.M., Lee, J.P., Park, C.H., Kim, S., Seo, J.H., Chang, K.A., Yu, E., Jeong, S.J., Chong, Y.H., and Suh, Y.H., *C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 β expression*. *FASEB J*, 2003. **17**(13): p. 1951-3.
87. Sumioka, A., Nagaishi, S., Yoshida, T., Lin, A., Miura, M., and Suzuki, T., *Role of 14-3-3 γ in FE65-dependent Gene Transactivation Mediated by the Amyloid β -Protein Precursor Cytoplasmic Fragment*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(51): p. 42364-42374.
88. Hoe, H.-S., Magill, L.A., Guenette, S., Fu, Z., Vicini, S., and Rebeck, G.W., *FE65 Interaction with the ApoE Receptor ApoEr2*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(34): p. 24521-24530.
89. Kinoshita, A., Shah, T., Tangredi, M.M., Strickland, D.K., and Hyman, B.T., *The Intracellular Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Transactivation Mediated by Amyloid Precursor Protein and Fe65*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(42): p. 41182-41188.
90. Rogelj, B., Mitchell, J.C., Miller, C.C.J., and McLoughlin, D.M., *The X11/Mint family of adaptor proteins*. *Brain Research Reviews*, 2006. **52**(2): p. 305-315.
91. Borg, J.P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B., *The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996. **16**(11): p. 6229-6241.
92. Okamoto, M., Nakajima, Y., Matsuyama, T., and Sugita, M., *Amyloid precursor protein associates independently and collaboratively with PTB and PDZ domains of mint on vesicles and at cell membrane*. *Neuroscience*, 2001. **104**(3): p. 653-665.
93. Long, J.-F., Feng, W., Wang, R., Chan, L.-N., Ip, F.C.F., Xia, J., Ip, N.Y., and Zhang, M., *Autoinhibition of X11/Mint scaffold proteins revealed by the closed conformation of the PDZ tandem*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(8): p. 722-728.
94. Borg, J.-P., Straight, S.W., Kaech, S.M., de Taddéo-Borg, M., Kroon, D.E., Karnak, D., Turner, R.S., Kim, S.K., and Margolis, B., *Identification of an Evolutionarily Conserved Heterotrimeric Protein Complex Involved in Protein Targeting*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(48): p. 31633-31636.
95. Okamoto, M. and Südhof, T.C., *Mints, Munc18-interacting Proteins in Synaptic Vesicle Exocytosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(50): p. 31459-31464.
96. Nakajima, Y., Okamoto, M., Nishimura, H., Obata, K., Kitano, H., Sugita, M., and Matsuyama, T., *Neuronal expression of mint1 and mint2, novel multimodular proteins, in adult murine brain*. *Molecular Brain Research*, 2001. **92**(1-2): p. 27-42.

97. Tomita, S., Ozaki, T., Taru, H., Oguchi, S., Takeda, S., Yagi, Y., Sakiyama, S., Kirino, Y., and Suzuki, T., *Interaction of a Neuron-specific Protein Containing PDZ Domains with Alzheimer's Amyloid Precursor Protein*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(4): p. 2243-2254.
98. McLoughlin, D.M., Standen, C.L., Lau, K.-F., Ackerley, S., Bartnikas, T.P., Gitlin, J.D., and Miller, C.C.J., *The Neuronal Adaptor Protein X11a Interacts with the Copper Chaperone for SOD1 and Regulates SOD1 Activity*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(12): p. 9303-9307.
99. Angeletti, B., Waldron, K.J., Freeman, K.B., Bawagan, H., Hussain, I., Miller, C.C.J., Lau, K.-F., Tennant, M.E., Dennison, C., Robinson, N.J., and Dingwall, C., *BACE1 Cytoplasmic Domain Interacts with the Copper Chaperone for Superoxide Dismutase-1 and Binds Copper*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(18): p. 17930-17937.
100. Kuan, Y.-H., Gruebl, T., Soba, P., Eggert, S., Nesic, I., Back, S., Kirsch, J., Beyreuther, K., and Kins, S., *PAT1a Modulates Intracellular Transport and Processing of Amyloid Precursor Protein (APP), APLP1, and APLP2*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(52): p. 40114-40123.
101. Pastorino, L., Sun, A., Lu, P.-J., Zhou, X.Z., Balastik, M., Finn, G., Wulf, G., Lim, J., Li, S.-H., Li, X., Xia, W., Nicholson, L.K., and Lu, K.P., *The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-[beta] production*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 528-534.
102. Liu, F.-L., Liu, P.-H., Shao, H.-W., and Kung, F.-L., *The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with FKBP12*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **350**(2): p. 472-477.
103. Tarr, P.E., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P.G., and D'Adamio, L., *Tyrosine Phosphorylation of the β -Amyloid Precursor Protein Cytoplasmic Tail Promotes Interaction with Shc*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(19): p. 16798-16804.
104. Iijima, K.-i., Ando, K., Takeda, S., Satoh, Y., Seki, T., Itohara, S., Greengard, P., Kirino, Y., Nairn, A.C., and Suzuki, T., *Neuron-Specific Phosphorylation of Alzheimer's Beta-Amyloid Precursor Protein by Cyclin-Dependent Kinase 5*. Journal of Neurochemistry, 2000. **75**(3): p. 1085-1091.
105. Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Town, T., Flavell, R.A., and Selkoe, D.J., *Physiological Regulation of the {beta}-Amyloid Precursor Protein Signaling Domain by c-Jun N-Terminal Kinase JNK3 during Neuronal Differentiation*. Journal of Neuroscience, 2005. **25**(23): p. 5533-5543.
106. Standen, C.L., Brownlees, J., Grierson, A.J., Kesavapany, S., Lau, K.F., McLoughlin, D.M., and Miller, C.C., *Phosphorylation of thr(668) in the cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein by stress-activated protein kinase 1b (Jun N-terminal kinase-3)*. J Neurochem, 2001. **76**(1): p. 316-20.
107. Inomata, H., Nakamura, Y., Hayakawa, A., Takata, H., Suzuki, T., Miyazawa, K., and Kitamura, N., *A Scaffold Protein JIP-1b Enhances Amyloid Precursor Protein Phosphorylation by JNK and Its Association with Kinesin Light Chain 1*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(25): p. 22946-22955.
108. Alpin, A.E., Gibb, G.M., Jacobsen, J.S., Gallo, J.-M., and Anderton, B.H., *In Vitro Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Amyloid Precursor Protein by Glycogen Synthase Kinase-3 β* . Journal of Neurochemistry, 1996. **67**(2): p. 699-707.

109. Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D.R., Czernik, A.J., Nairn, A.C., and Greengard, P., *Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein*. EMBO J, 1994. **13**(5): p. 1114-22.
110. Lee, M.-S., Kao, S.-C., Lemere, C.A., Xia, W., Tseng, H.-C., Zhou, Y., Neve, R., Ahljanian, M.K., and Tsai, L.-H., *APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation*. The Journal of Cell Biology, 2003. **163**(1): p. 83-95.
111. Tarr, P.E., Contursi, C., Roncarati, R., Noviello, C., Gherzi, E., Scheinfeld, M.H., Zambrano, N., Russo, T., and D'Adamio, L., *Evidence for a role of the nerve growth factor receptor TrkA in tyrosine phosphorylation and processing of [beta]-APP*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **295**(2): p. 324-329.
112. Fields, S. and Song, O.-k., *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-246.
113. Allen, J.B., Walberg, M.W., Edwards, M.C., and Elledge, S.J., *Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match*. Trends in Biochemical Sciences, 1995. **20**(12): p. 511-516.
114. Clontech, *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual*. 2010.
115. Bressler, S.L., Gray, M.D., Sopher, B.L., Hu, Q.B., Hearn, M.G., Pham, D.G., Dinulos, M.B., Fukuchi, K.I., Sisodia, S.S., Miller, M.A., Distèche, C.M., and Martin, G.M., *cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: Interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein*. Human Molecular Genetics, 1996. **5**(10): p. 1589-1598.
116. Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A., and Russo, T., *The Regions of the Fe65 Protein Homologous to the Phosphotyrosine Interaction/Phosphotyrosine Binding Domain of Shc Bind the Intracellular Domain of the Alzheimer's Amyloid Precursor Protein*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(52): p. 30853-30856.
117. Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G., *Exchange of N-CoR Corepressor and Tip60 Coactivator Complexes Links Gene Expression by NF-[kappa]B and [beta]-Amyloid Precursor Protein*. Cell, 2002. **110**(1): p. 55-67.
118. Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., Hansen, U., and Russo, T., *Fe65, a Ligand of the Alzheimer's β -Amyloid Precursor Protein, Blocks Cell Cycle Progression by Down-regulating Thymidylate Synthase Expression*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(38): p. 35481-35488.
119. Chang, K.-A., Kim, H.-S., Ha, T.-Y., Ha, J.-W., Shin, K.Y., Jeong, Y.H., Lee, J.-P., Park, C.-H., Kim, S., Baik, T.-K., and Suh, Y.-H., *Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein (APP) at Thr668 Regulates the Nuclear Translocation of the APP Intracellular Domain and Induces Neurodegeneration*. Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(11): p. 4327-4338.
120. Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kowarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Müller, U., Hyslop, P.S.G., and Checler, F., *Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the A[beta]-Degrading Enzyme Neprilysin by Intracellular Domains of [beta]APP and APLP*. Neuron, 2005. **46**(4): p. 541-554.

121. Graef, I.A., Mermelstein, P.G., Stankunas, K., Neilson, J.R., Deisseroth, K., Tsien, R.W., and Crabtree, G.R., *L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 703-708.
122. Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R., and Avila, J., *Decreased nuclear [beta]-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3[beta] conditional transgenic mice*. *EMBO J*, 2001. **20**(1/2): p. 27-39.
123. Beurel, E. and Jope, R.S., *The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways*. *Progress in Neurobiology*, 2006. **79**(4): p. 173-189.
124. Maecker, H.T., Todd, S.C., and Levy, S., *The tetraspanin superfamily: molecular facilitators*. *The FASEB Journal*, 1997. **11**(6): p. 428-442.
125. Danenberg, P.V., *Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1977. **473**(2): p. 73-92.
126. Houghton, J.A., Harwood, F.G., and Houghton, P.J., *Cell Cycle Control Processes Determine Cytostasis or Cytotoxicity in Thymineless Death of Colon Cancer Cells*. *Cancer Research*, 1994. **54**(18): p. 4967-4973.
127. Carson, J.A. and Turner, A.J., *beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases?* *Journal of Neurochemistry*, 2002. **81**(1): p. 1-8.
128. Howell, S., Nalbantoglu, J., and Crine, P., *Neutral endopeptidase can hydrolyze [beta]-amyloid(1-40) but shows no effect on [beta]-amyloid precursor protein metabolism*. *Peptides*, 1995. **16**(4): p. 647-652.
129. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.-J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T.C., *Identification of the major A[beta]1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition*. *Nat Med*, 2000. **6**(2): p. 143-150.
130. Santiard-Baron, D., Langui, D., Delehedde, M., Delatour, B., Schombert, B., Touchet, N., Tremp, G., Paul, M.F., Blanchard, V., Sergeant, N., Delacourte, A., Duyckaerts, C., Pradier, L., and Mercken, L., *Expression of human FE65 in amyloid precursor protein transgenic mice is associated with a reduction in beta-amyloid load*. *J Neurochem*, 2005. **93**(2): p. 330-8.
131. Sabo, S.L., Lanier, L.M., Ikin, A.F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., and Buxbaum, J.D., *Regulation of β -Amyloid Secretion by FE65, an Amyloid Protein Precursor-binding Protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(12): p. 7952-7957.
132. Hu, Q., Jin, L.W., Starbuck, M.Y., and Martin, G.M., *Broadly altered expression of the mRNA isoforms of FE65, a facilitator of beta amyloidogenesis, in Alzheimer cerebellum and other brain regions*. *J Neurosci Res*, 2000. **60**(1): p. 73-86.
133. Zhou, M.M., Ravichandran, K.S., Olejniczak, E.F., Petros, A.M., Meadows, R.P., Sattler, M., Harlan, J.E., Wade, W.S., Burakoff, S.J., and Fesik, S.W., *Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc*. *Nature*, 1995. **378**(6557): p. 584-92.
134. Zambrano, N., Buxbaum, J.D., Minopoli, G., Fiore, F., DeCandia, P., DeRenzis, S., Faraonio, R., Sabo, S., Cheetham, J., Sudol, M., and Russon, T., *Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with*

- wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(10): p. 6399-6405.
135. Zhou, D.W., Zambrano, N., Russo, T., and D'Adamio, L., *Phosphorylation of a Tyrosine in the Amyloid-beta Protein Precursor Intracellular Domain Inhibits Fe65 Binding and Signaling*. *Journal of Alzheimers Disease*, 2009. **16**(2): p. 301-307.
136. Howell, B.W., Lanier, L.M., Frank, R., Gertler, F.B., and Cooper, J.A., *The Disabled 1 Phosphotyrosine-Binding Domain Binds to the Internalization Signals of Transmembrane Glycoproteins and to Phospholipids*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. **19**(7): p. 5179-5188.
137. Scheinfeld, M.H., Roncarati, R., Vito, P., Lopez, P.A., Abdallah, M., and D'Adamio, L., *Jun NH2-terminal Kinase (JNK) Interacting Protein 1 (JIP1) Binds the Cytoplasmic Domain of the Alzheimer's β -Amyloid Precursor Protein (APP)*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(5): p. 3767-3775.
138. Zhang, Z., Lee, C.-H., Mandiyan, V., Borg, J.-P., Margolis, B., Schlessinger, J., and Kuriyan, J., *Sequence-specific recognition of the internalization motif of the Alzheimer's amyloid precursor protein by the X11 PTB domain*. *EMBO J*, 1997. **16**(20): p. 6141-6150.
139. Jacobs, E.H., Williams, R.J., and Francis, P.T., *Cyclin-dependent kinase 5, Munc18a and Munc18-interacting protein 1/X11[alpha] protein up-regulation in Alzheimer's disease*. *Neuroscience*, 2006. **138**(2): p. 511-522.
140. Kesavapany, S., Banner, S.J., Lau, K.F., Shaw, C.E., Miller, C.C.J., Cooper, J.D., and McLoughlin, D.M., *Expression of the Fe65 adapter protein in adult and developing mouse brain*. *Neuroscience*, 2002. **115**(3): p. 951-960.
141. Domingues, S., *Identificação de complexos proteicos na Doença de Alzheimer*, 2010. Tese de Doutoramento submetida à Universidade de Aveiro, Universidade de Aveiro
142. Matsui, T., Ingelsson, M., Fukumoto, H., Ramasamy, K., Kowa, H., Frosch, M.P., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T., *Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease*. *Brain Research*, 2007. **1161**: p. 116-123.
143. Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., May, P.C., Ponte, P.A., Cordell, B., and Finch, C.E., *Selective reduction of mRNA for the [beta]-amyloid precursor protein that lacks a Kunitz-type protease inhibitor motif in cortex from Alzheimer brains*. *Experimental Neurology*, 1988. **102**(2): p. 264-268.
144. Spillantini, M.G., Hunt, S.P., Ulrich, J., and Goedert, M., *Expression and cellular localization of amyloid beta-protein precursor transcripts in normal human brain and in Alzheimer's disease*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1989. **6**(2-3): p. 143-50.
145. Hyman, B.T., Wenniger, J.J., and Tanzi, R.E., *Nonisotopic in situ hybridization of amyloid beta protein precursor in Alzheimer's disease: expression in neurofibrillary tangle bearing neurons and in the microenvironment surrounding senile plaques*. *Molecular Brain Research*, 1993. **18**(3): p. 253-258.
146. Cao, X. and Sudhof, T.C., *Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24601-11.
147. Ho, L., Fukuchi, K.-i., and Younkin, S.G., *The Alternatively Spliced Kunitz Protease Inhibitor Domain Alters Amyloid β Protein Precursor Processing and Amyloid β Protein Production in Cultured Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(48): p. 30929-30934.

Apêndice

Apendice I

Soluções e meios de cultura

Solução Dropout10X

Esta solução contém todos os aminoácidos mas faltam um ou mais componentes na solução utilizada, neste caso o meio carece de L-Histidina, L-Leucina e L-Triptofano

	Concentração 10X (mg/L)	Sigma #
L-Isoleucina	300	I-7383
L-Valina	1500	V-0500
L-Adenina	200	A-9126
L-Arginina	200	A-5131
L-Histidina	200	H-9511
L-Leucina	1000	L-1512
L-Lisina	300	L-1262
L-Metionina	200	M-9625
L-Fenilalanina	500	P-5030
L-Treonina	2000	T-8625
L-Triptofano	200	T-0254
L-Tirosina	300	T-3754
L-Uracilo	200	U-0750

A solução deve ser autoclavada e pode-se guardar durante um ano

Meio Sintético SD/TDO

A 850 mL de H₂O desionizada adicionar:

6,7g Base de nitrogénio para levedura sem aminoácidos

Misturar a solução até o soluto estar dissolvido e esterilizar autoclavando. Esperar que a temperatura baixe os 60°C e adicionar glucose até 2% (50 mL de solução a 40% estéril) e 100mL de solução dropout10X apropriada.

Meio SOB

A 950 mL de H₂O desionizada adicionar:

Tryptona – 20g

Extrato de Levedura – 5g

NaCl – 0,5g

Adicionar parte da água e agitar até dissolver. Adicionar 10 mL de KCl 250 mM. Ajustar a pH 7.0 com NaOH 5 N e ajustar o volume para 1 L. Autoclavar e quando arrefecer adicionar 5 mL MgCl₂ 2M.

Meio SOC

A 980 mL de meio SOB adicionar 20 mL de glucose 1 M estéril (esta solução é preparada dissolvendo 18g de glucose em 90 mL de h₂O desionizada; depois da glucose se dissolver ajustar o volume a 100 mL com H₂O desionizada e esterilizar filtrando a solução através de micro filtro-0.22)

STET

8% Sacarose

5% Triton X-100

50 mM Tris-HCl (ph 8.5)

50 mM EDTA

Soluções de Miniprep

Solução I:

50 mM glucose
10 mM EDTA
25 mM Tris (pH 8.0)

Solução II:

0,2 N NaOH
1% SDS

Solução III:

3 M KOAc
185 mM ácido acético

Soluções das células competentes

Solução I (para 1 L)

9,9g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,
15g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
150g de glicerol,
30 mL de KHAc 1M

Acertar o pH 5,8 com HAc e filtrar com um filtro de 0,2 μm .
Guardar a 4°C

Solução II (para 1L)

20 mL MOPS 0,5M pH 6.8
1,2g RbCl
11g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
150g de glicerol

filtrar por um filtro de 0,2 μm e guardar a 4°C

Placas de LB\Amp

12,5g LB

7,5g de Agar

500 mL H₂O

Autoclavar e adicionar 1 mL de Ampicilina (100 µg/mL)

TAE 50X (Solução stock) - 1L

242 g Tris Base

57,1 mL Ácido acético glacial

100 mL EDTA 0.5M pH 8.0

Adicionar água destilada até perfazer o volume. Filtrar num filtro de 0,2 µm.

TAE 1X

Diluir a solução stock 50x em água destilada

Tampão de amostra (Loading Buffer) 6X

30% Glicerol

0,25% Azul de Bromofenol

Apêndice II

Electroforese em géis de agarose

Os géis apresentam em cima o numero da colónia de *E.coli* e o clone do qual foi extraído o DNA plasmídico após a transformação

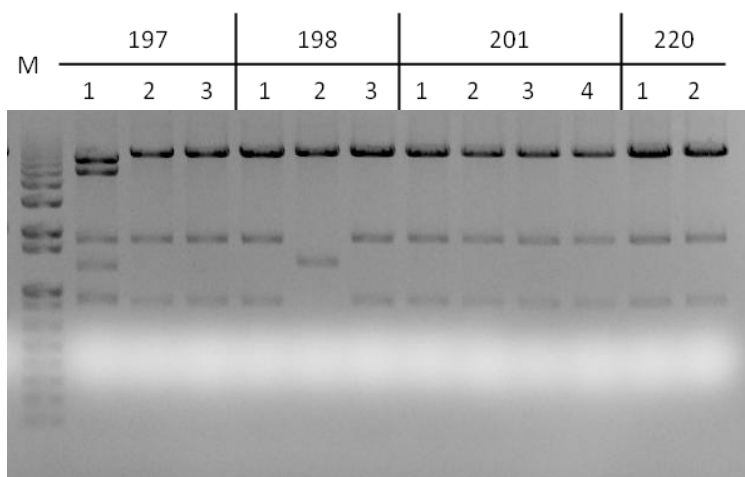


Figura 17 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 197, 198, 201 e 220. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder plus

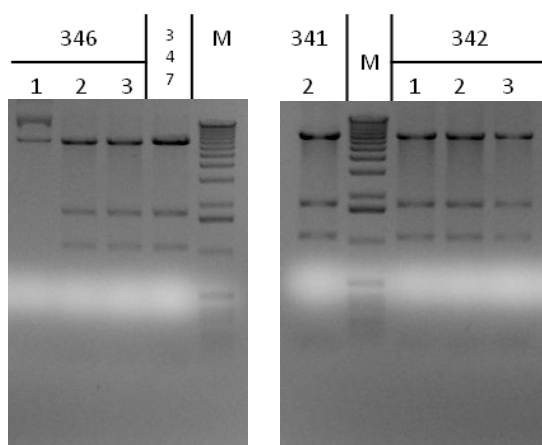


Figura 16 – Electorforese em géis de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 346, 347, 342 e uma colónia de bactéria do clone 341. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

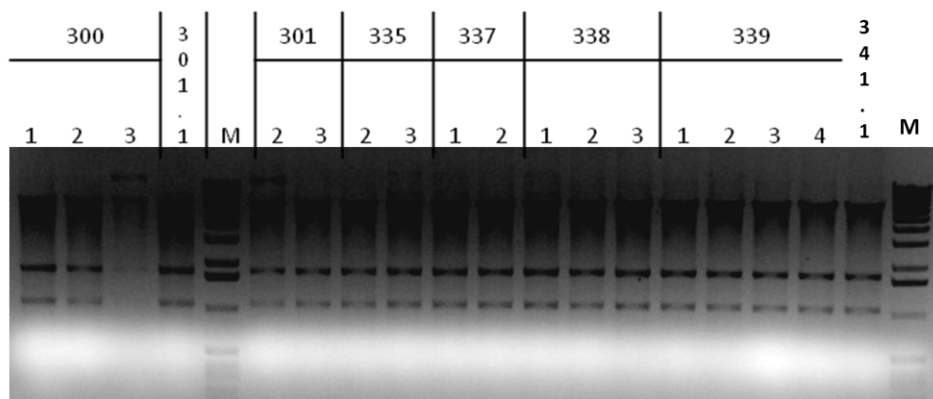


Figura 18 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 300, 301, 335, 337, 338, 339 e uma colónia de bactéria do clone 341. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

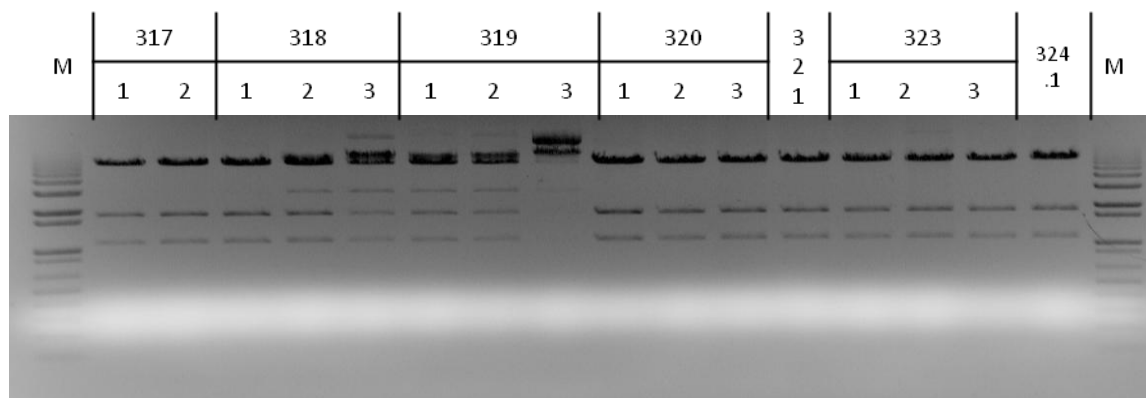


Figura 19 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 317, 318, 319, 320, 321, 323 e 324. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

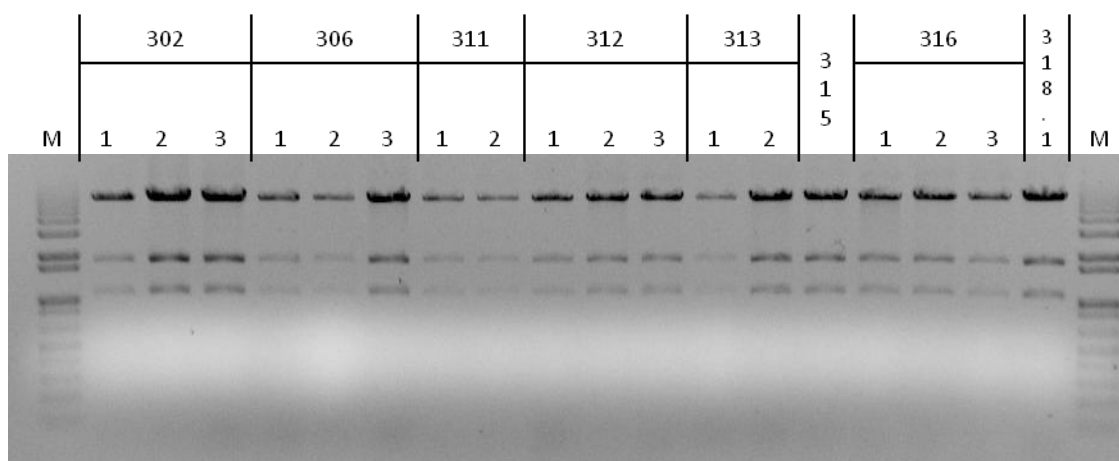


Figura 20 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 302, 306, 311, 312, 313, 315, 316 e uma colónia de bactéria do clone 318. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

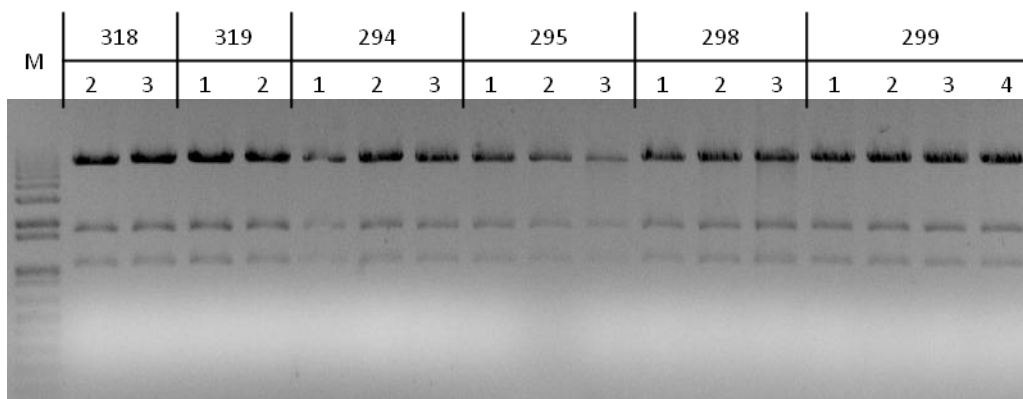


Figura 21 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 318, 319, 294, 295, 298, 299. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

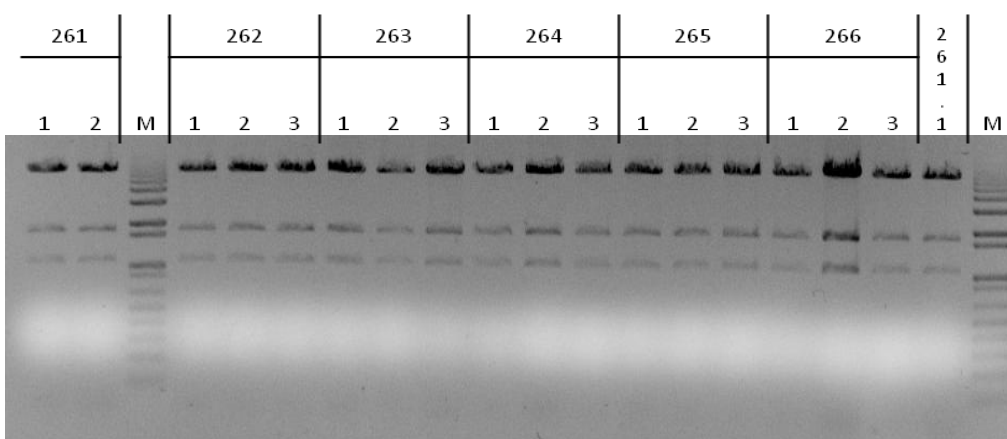


Figura 22 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 261, 262, 263, 264, 265, 266 e uma colónia de bactéria do clone 261. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

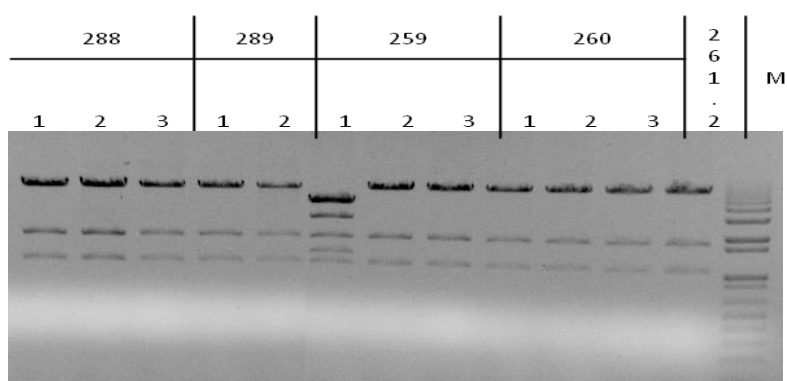


Figura 23 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 288, 289, 259 260 e 261. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

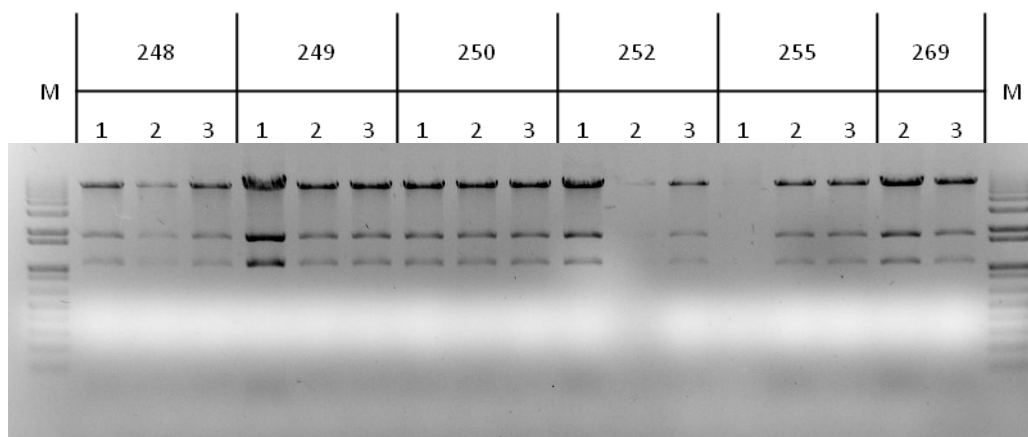


Figura 24 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 248, 249, 250, 252, 255, e 269. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

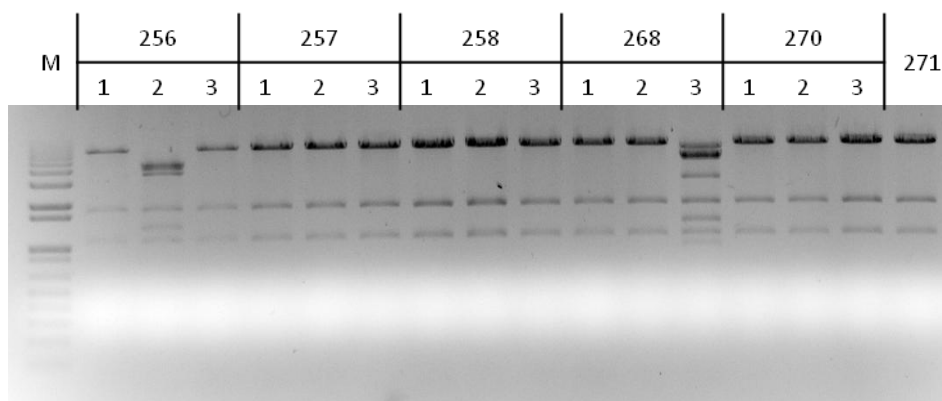


Figura 25 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 197, 198, 201 e 220. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

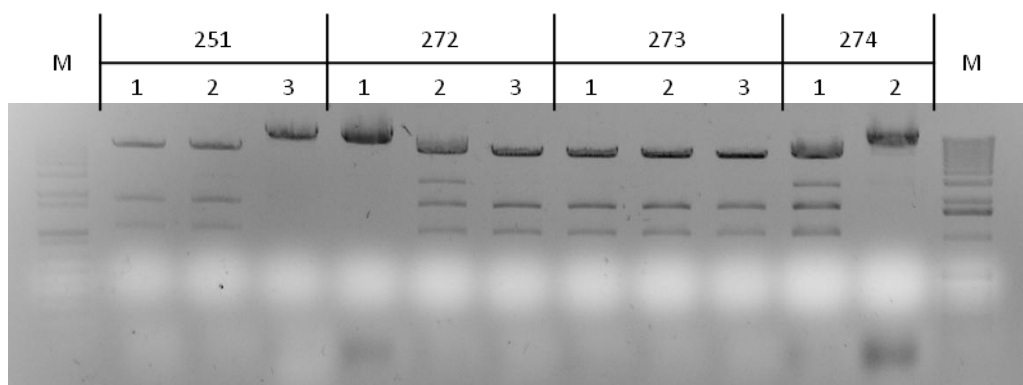


Figura 26 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 251, 272, 273 e 274. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

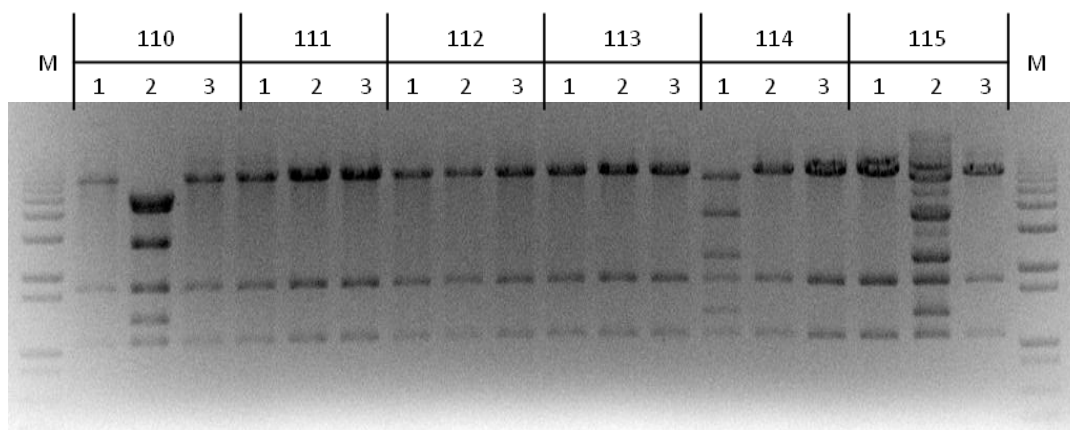


Figura 27 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 110, 111, 112, 113,114 e 115. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

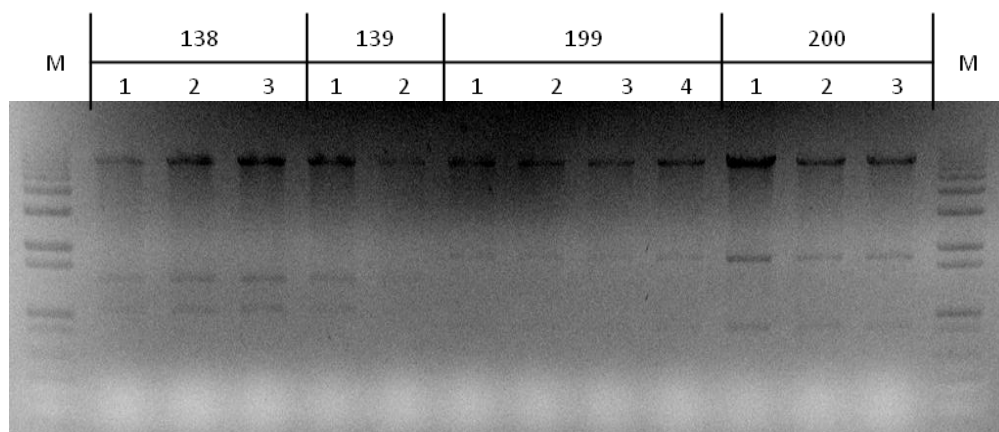


Figura 28 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 138, 139, 199 e 200. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

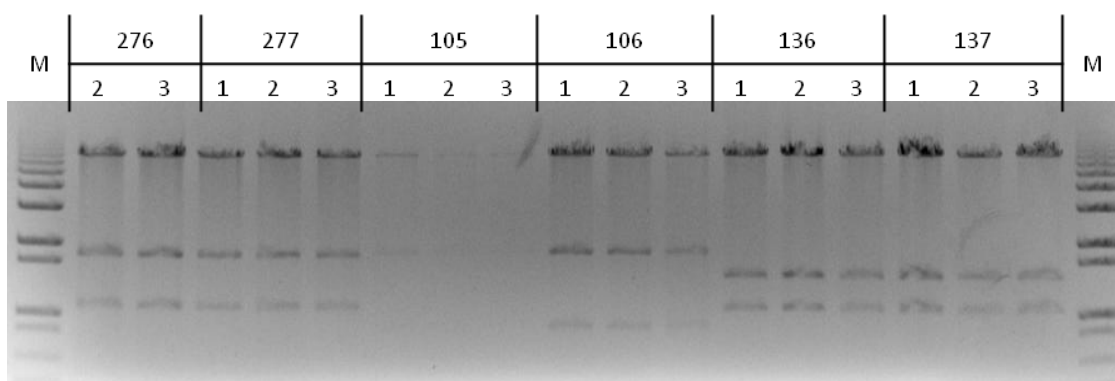


Figura 29 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 267, 277, 105, 106, 136 e 137. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder plus

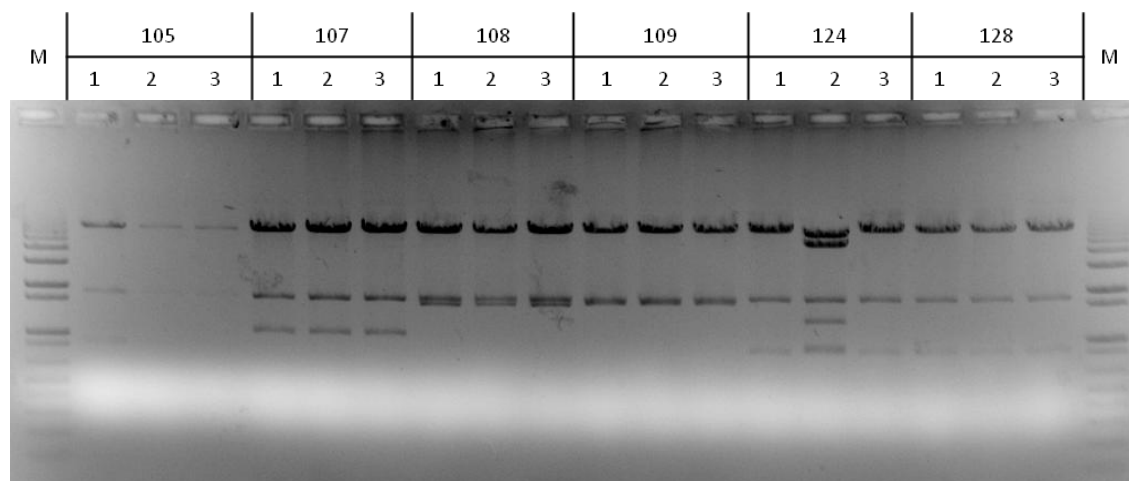


Figura 30 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 105, 107, 108, 109, 124 e 128. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

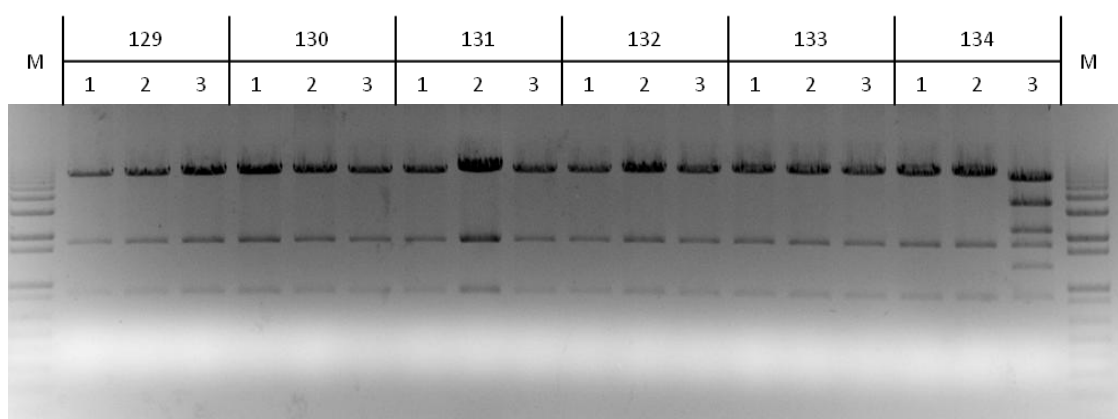


Figura 31 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 129, 130, 131, 132, 133 e 134. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

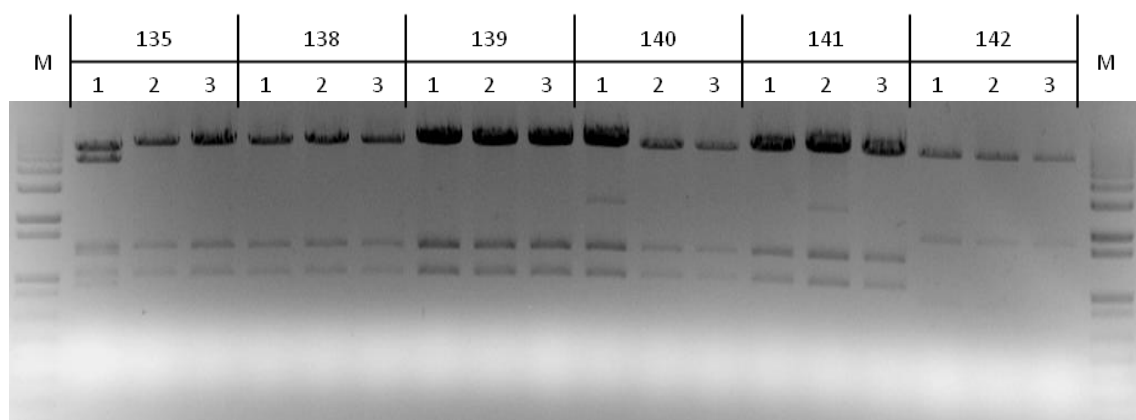


Figura 32 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 135, 138, 139, 140, 141 e 142. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

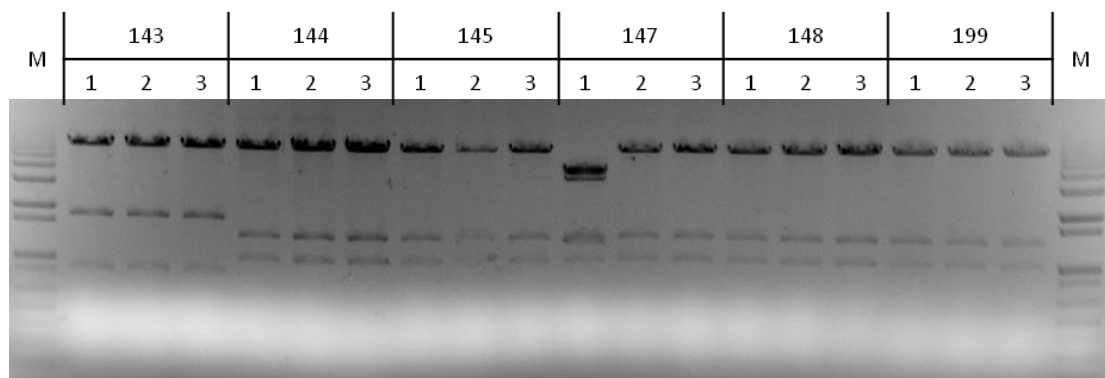


Figura 33 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 143, 144, 145, 147, 148 e 149. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

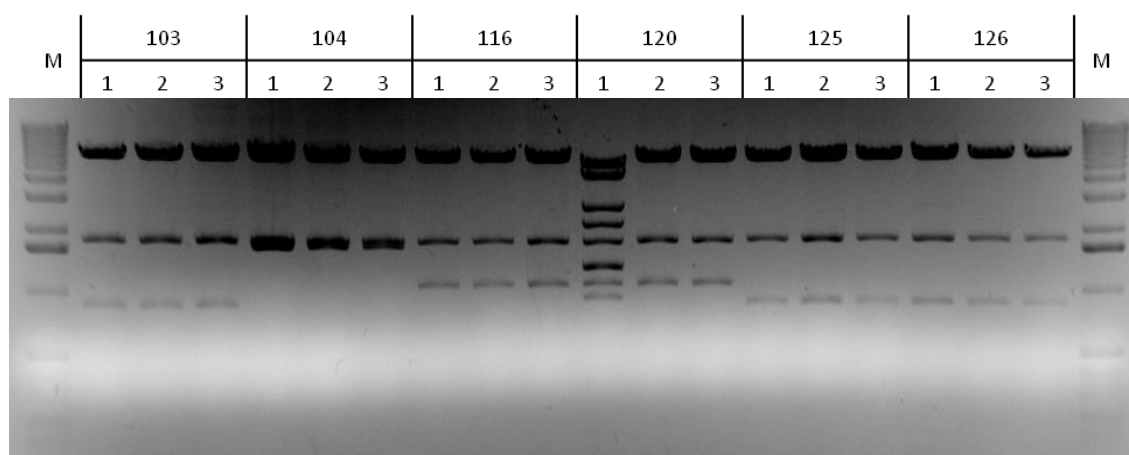


Figura 34 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 103, 104, 116, 120, 125 e 126. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

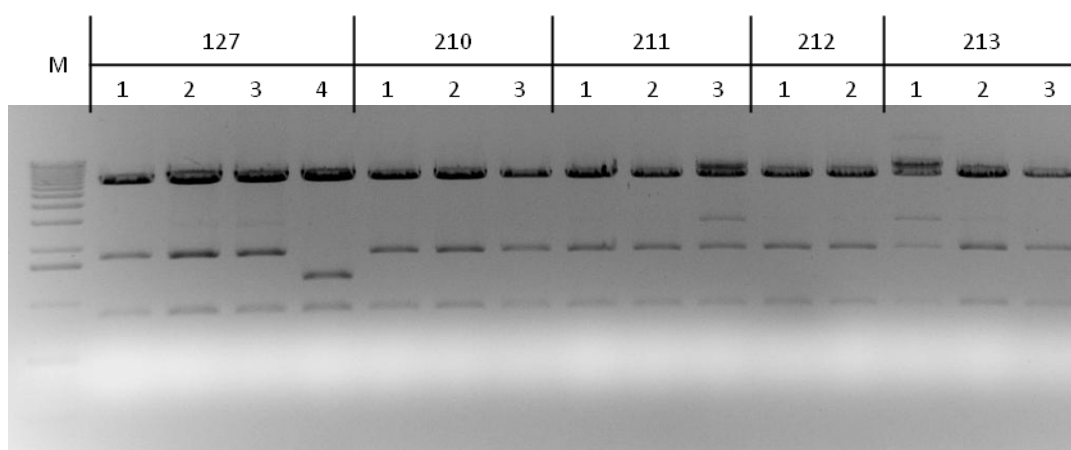


Figura 35 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 127, 210, 211, 212 e 213. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

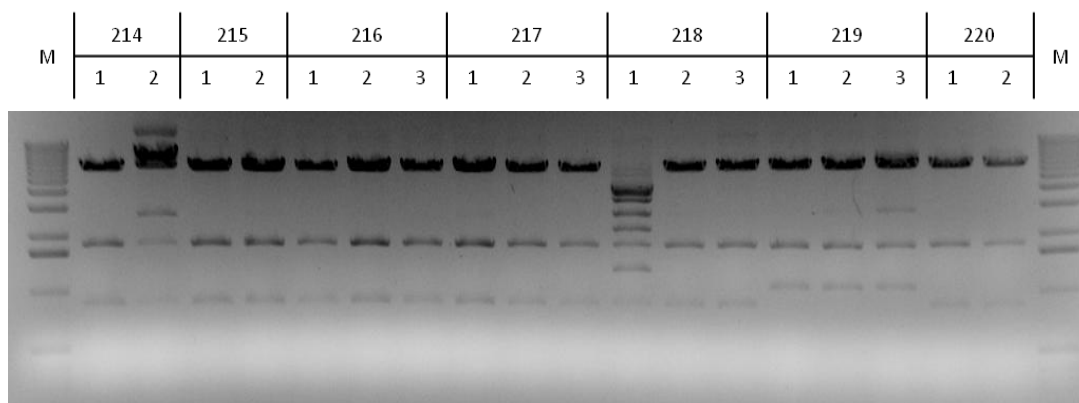


Figura 36 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 214, 215, 216, 217, 218, 219 e 220. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

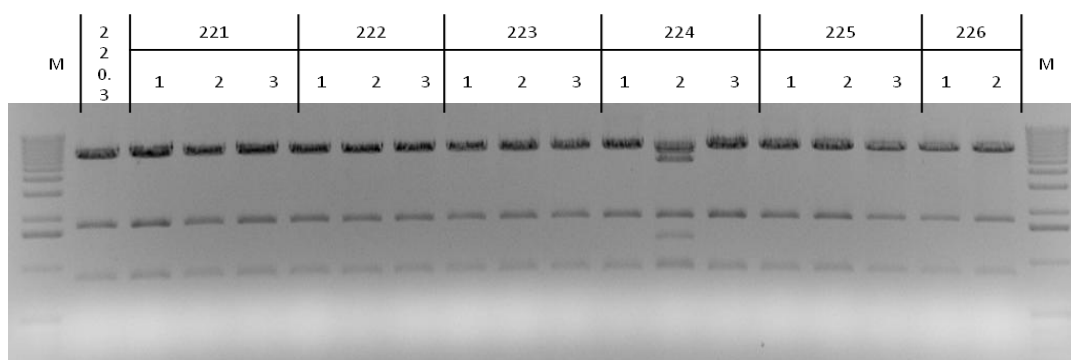


Figura 37 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 221, 222, 223, 224, 225, 226 e uma colónia de bactéria do clone 220. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

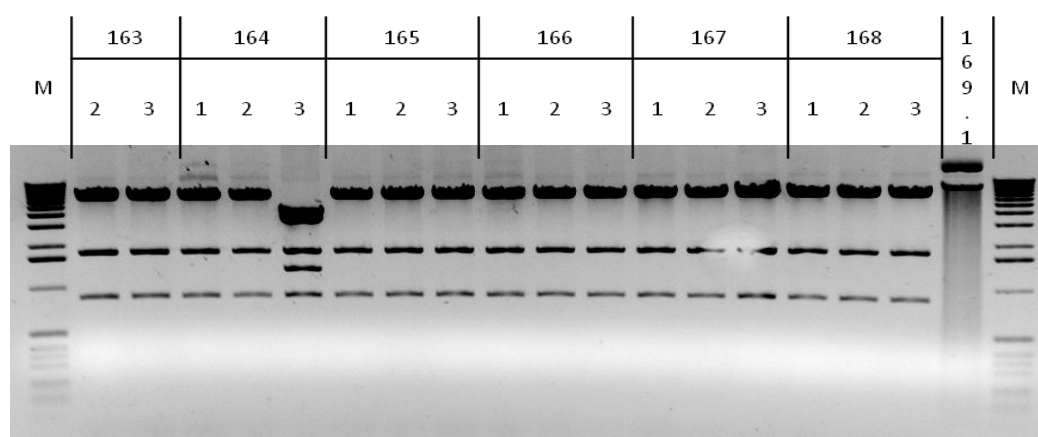


Figura 38 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 163, 164, 165, 166, 167, 168 e uma colónia de bactéria do clone 169. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

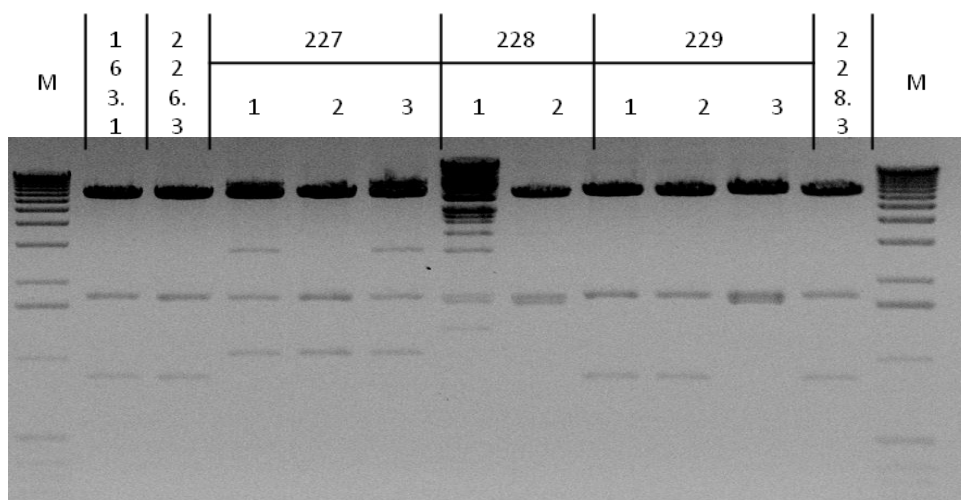


Figura 39 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 227, 228, 229 e colónias individuais dos clones 163, 226 e 228. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

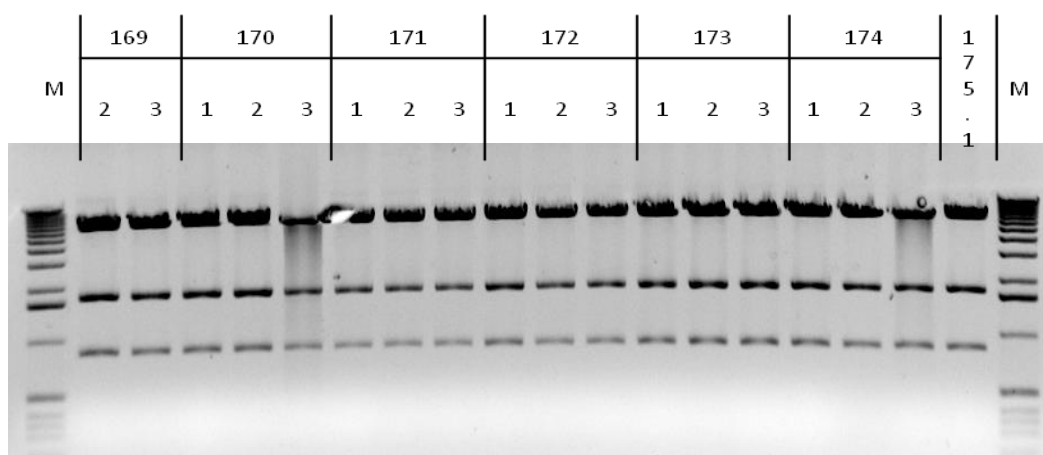


Figura 40 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 169, 170, 171, 172, 173, 174 e uma colónia de bactériado clone 175. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

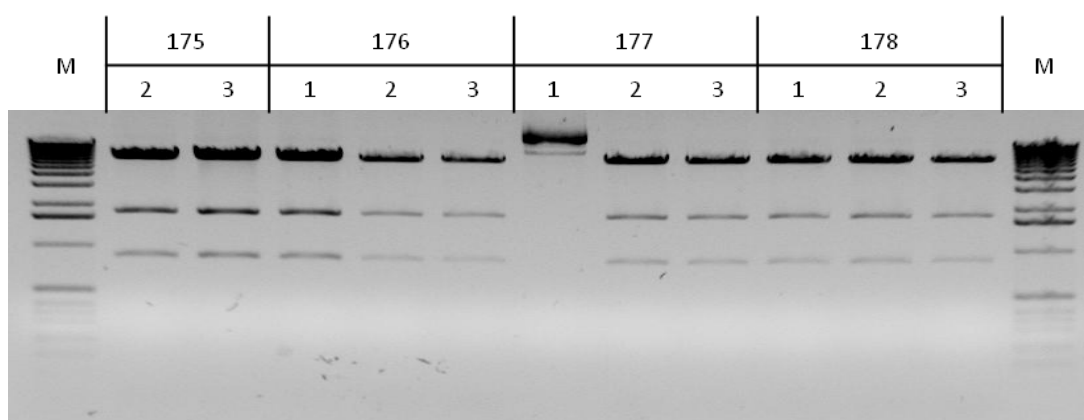


Figura 41 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 175, 176, 177 e 178. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

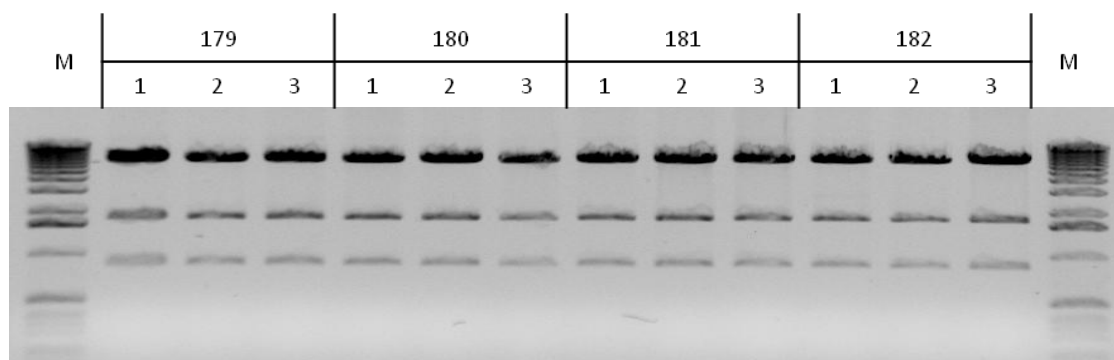


Figura 42 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 179, 180, 181 e 182. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

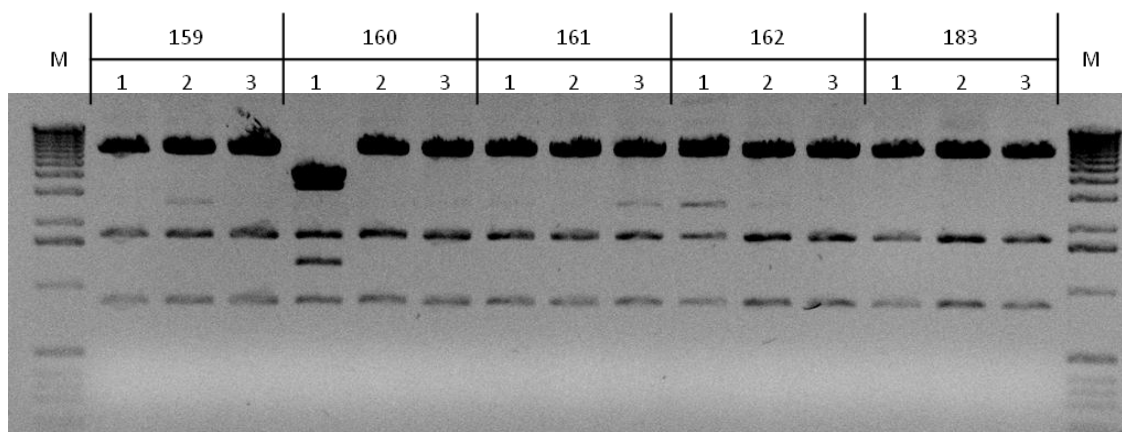


Figura 43 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 159, 160, 161, 162 e 183. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

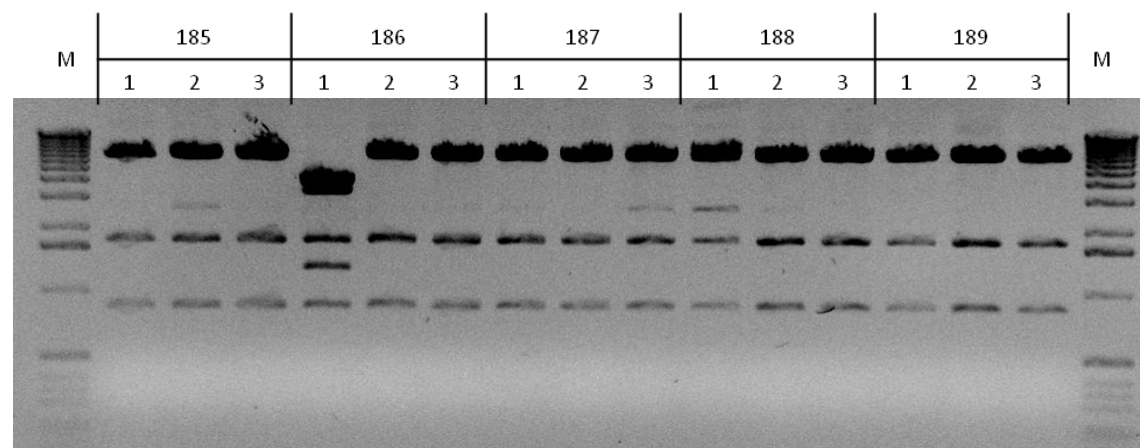


Figura 44 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 185, 186, 187, 188 e 189. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

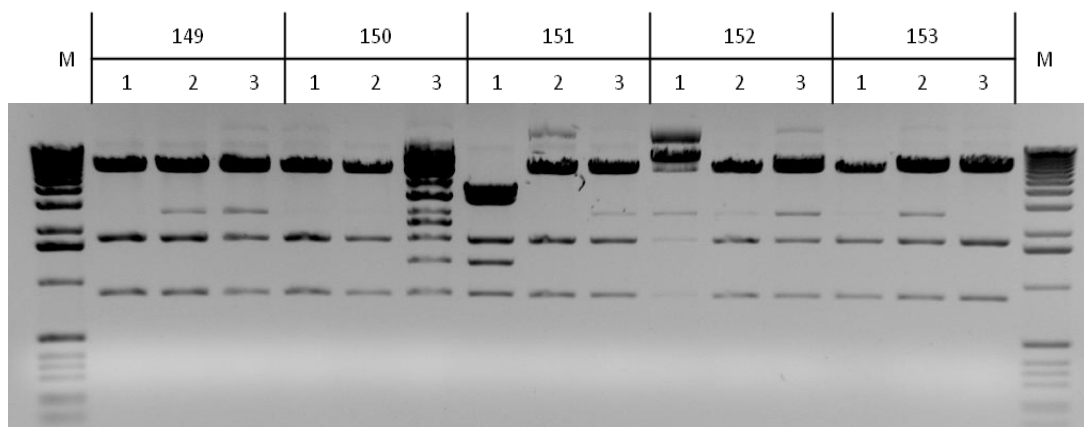


Figura 45 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 149, 150, 151, 152 e 153. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

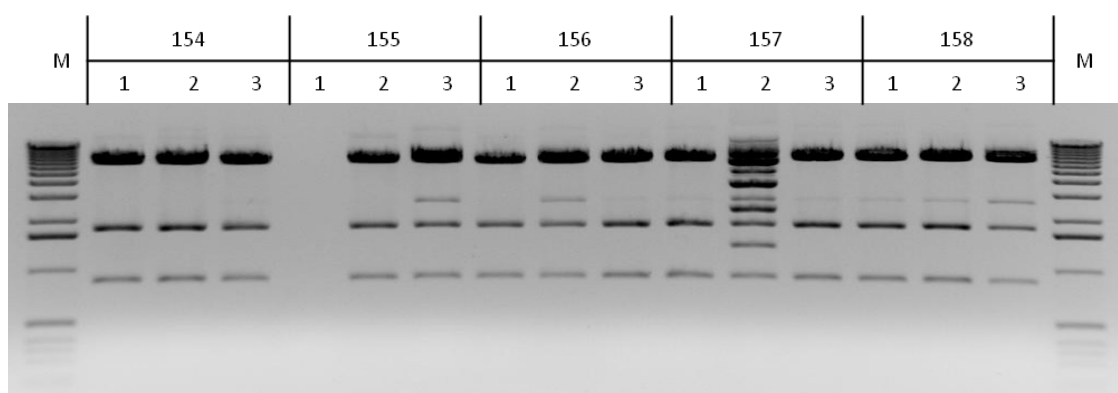


Figura 46 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 154, 155, 156, 157 e 158. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder



Figura 47 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 230, 231, 232, 233, 234 e 235. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

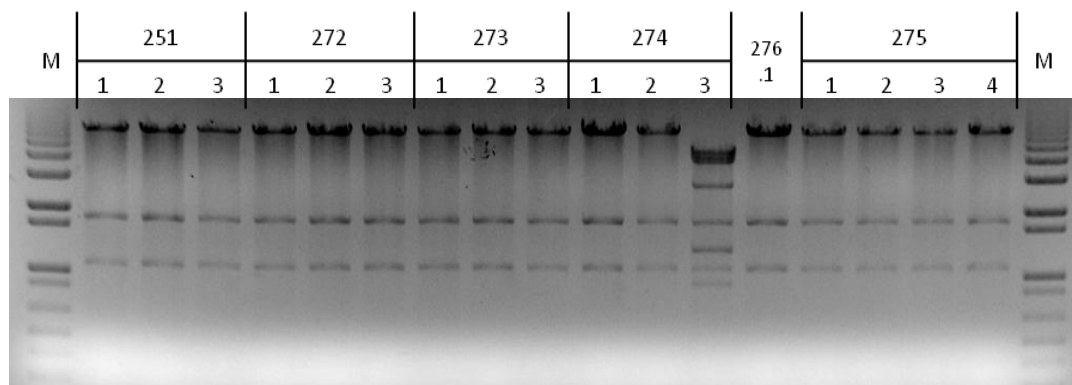


Figura 48 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 197, 198, 201 e 220. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder plus

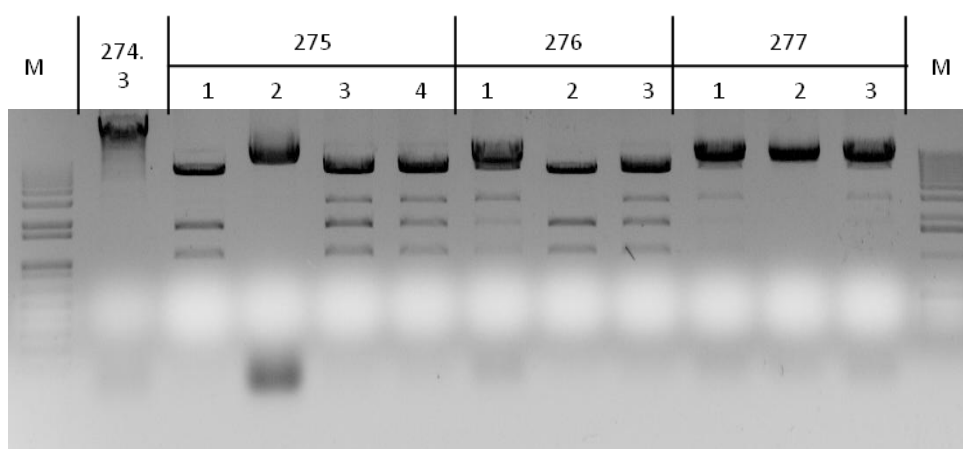


Figura 49 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 275, 276, 277 e uma colónia de bactéria do clone 274. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

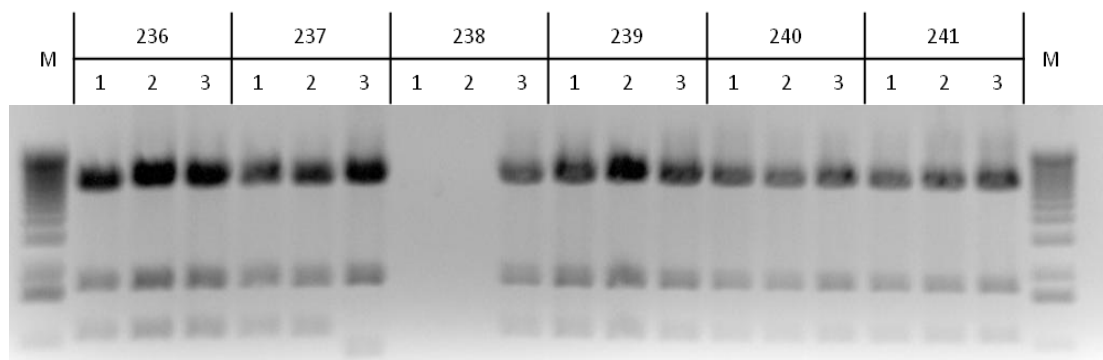


Figura 50 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 197, 198, 201 e 220. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

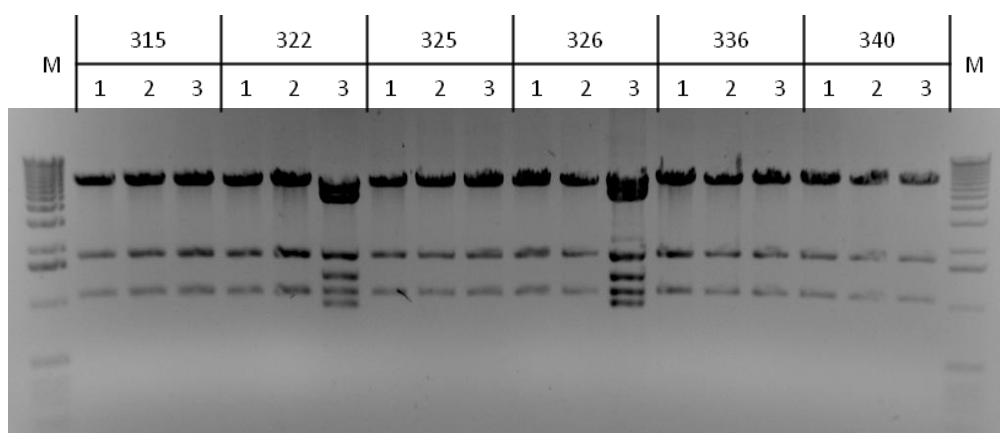


Figura 51 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 197, 198, 201 e 220. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

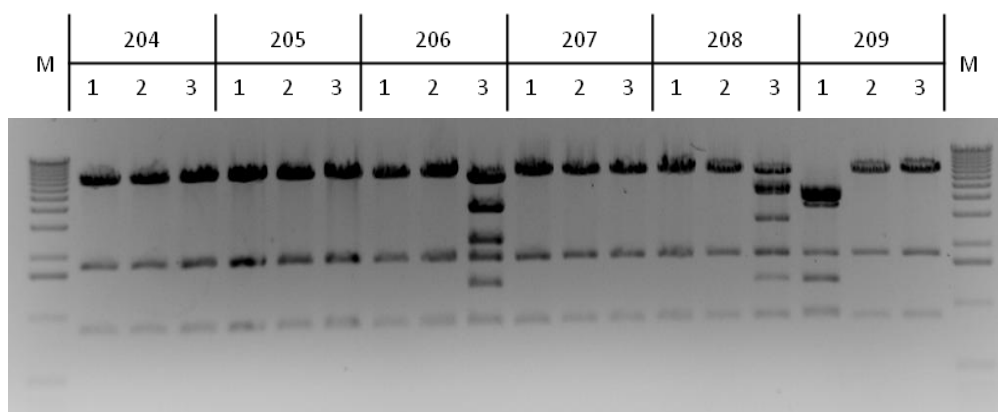


Figura 52 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 204, 205, 206, 207, 208 e 209. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

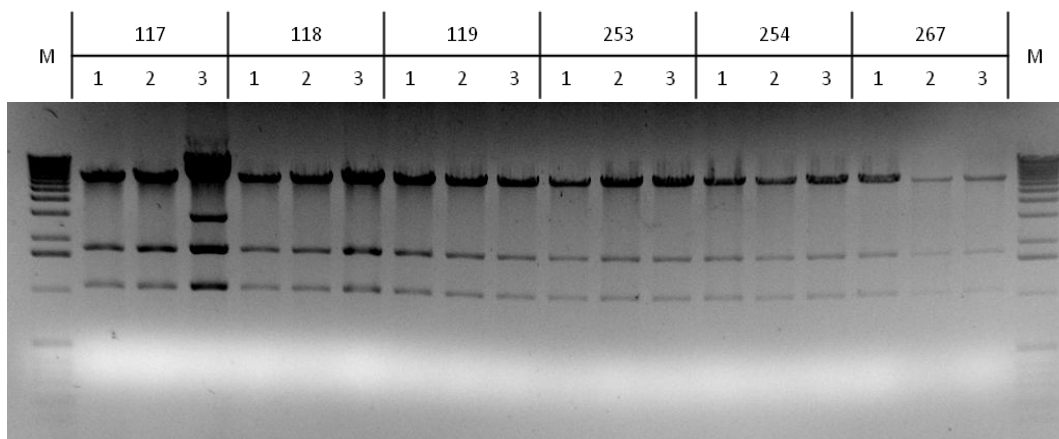


Figura 53 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 117, 228, 228, 253, 254 e 267. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

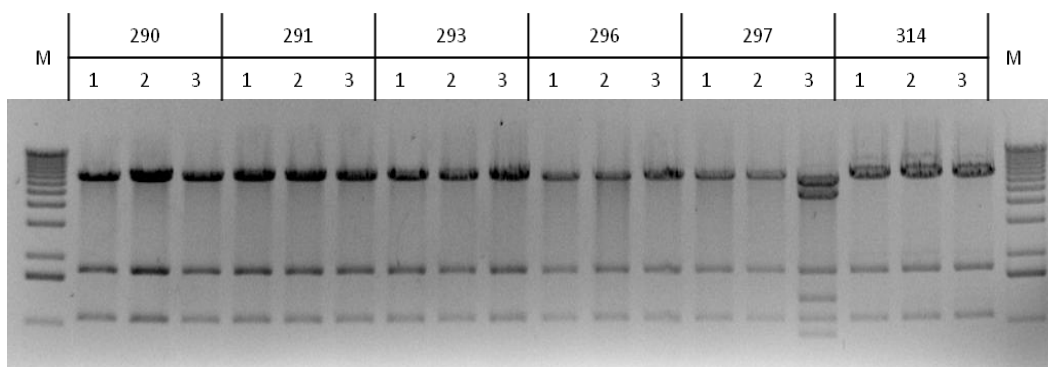


Figura 54 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 290, 291, 293, 296, 297 e 314. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

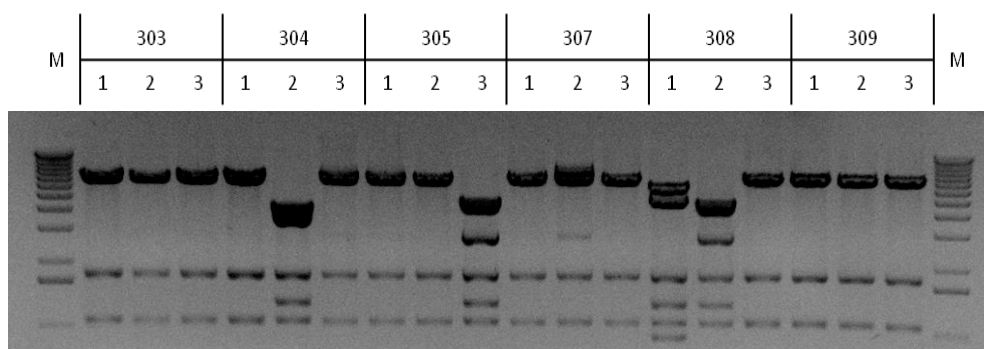


Figura 55 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 303, 304, 305, 307, 308 e 309. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

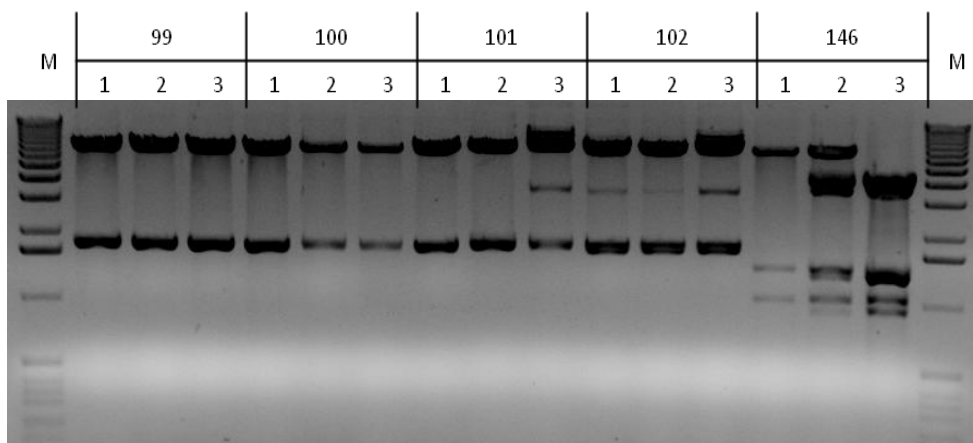


Figura 56 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 99, 100, 101, 102 e 146. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

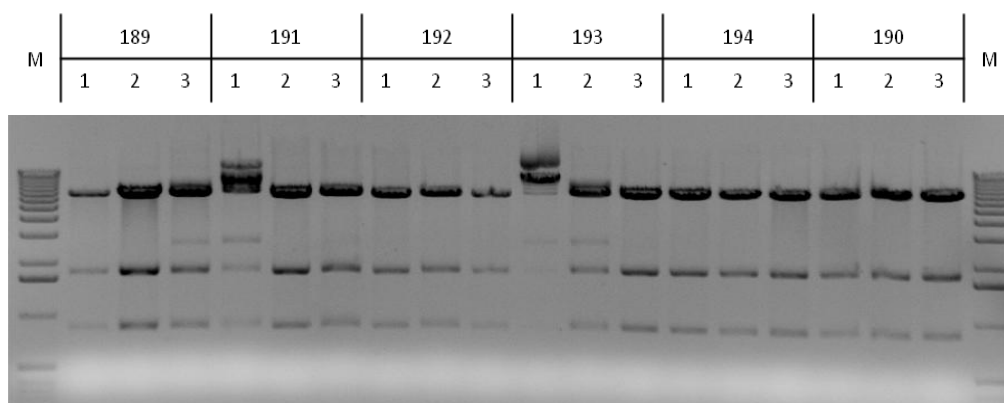


Figura 57 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 189, 191, 192, 193, 194 e 190. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

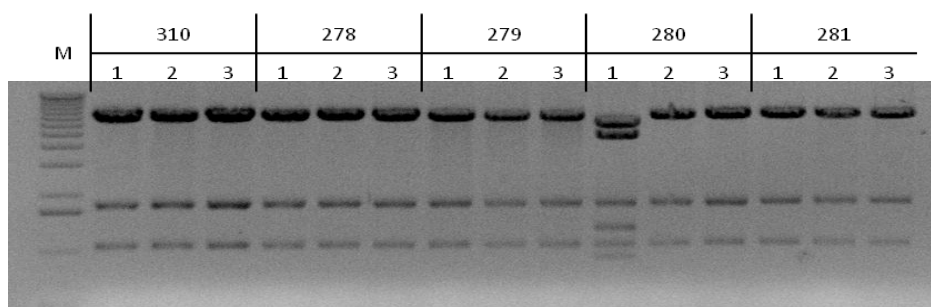


Figura 58 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 310, 278, 279, 280 e 281. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

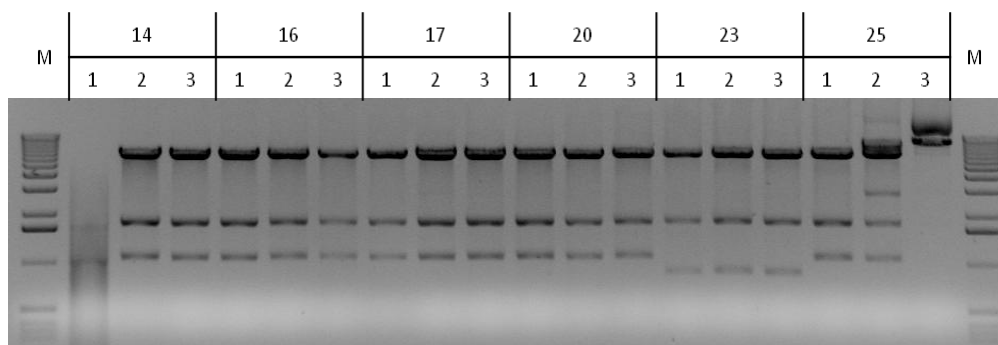


Figura 59 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 14, 16, 17, 20, 23 e 25. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

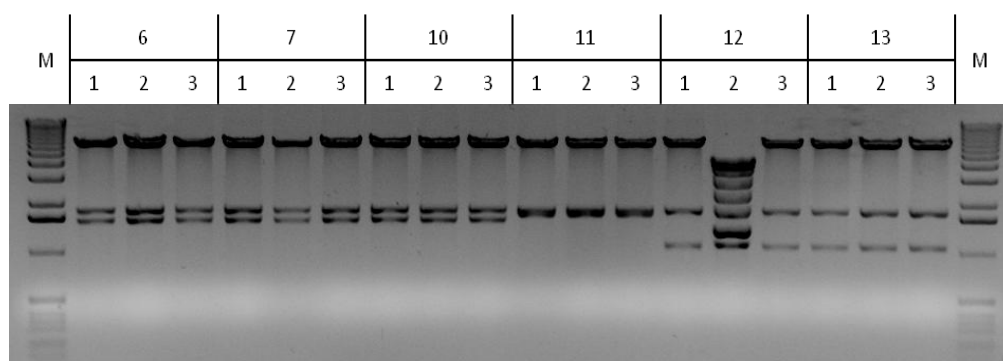


Figura 60 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 1976, 7, 10, 11, 12 e 13. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

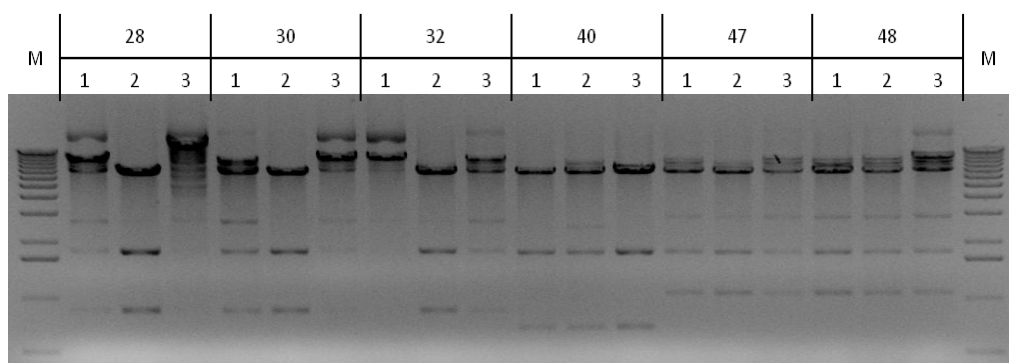


Figura 61 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 28, 29, 30, 32, 40, 47 e 48. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

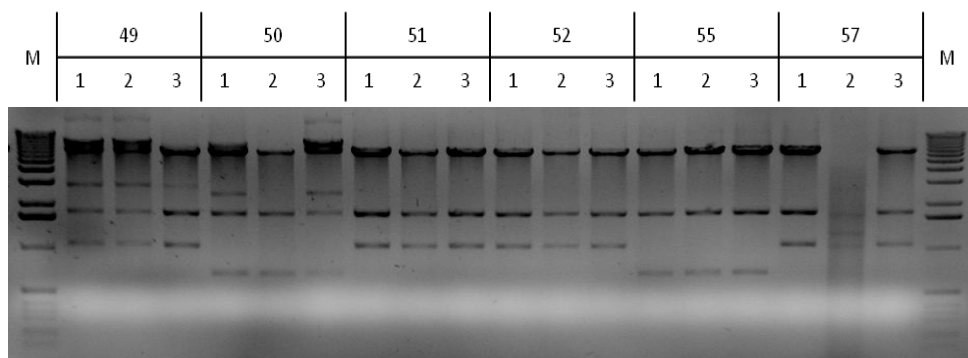


Figura 62 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 49, 50, 51, 52, 55 e 57. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

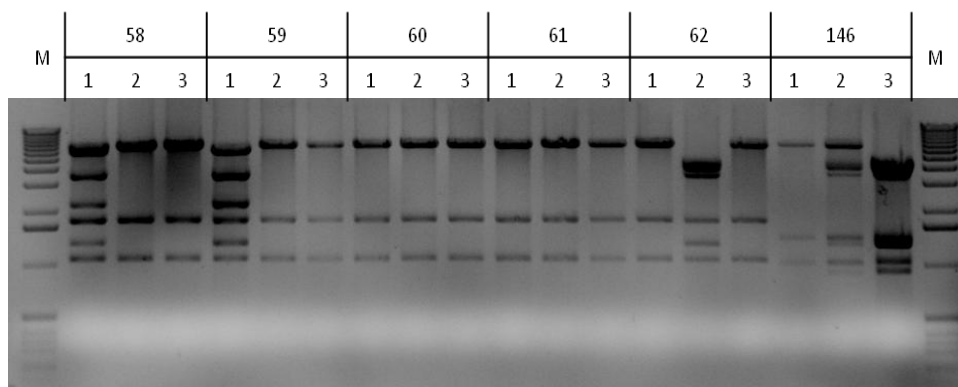


Figura 63 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 58,59, 60, 61, 62 e 146. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

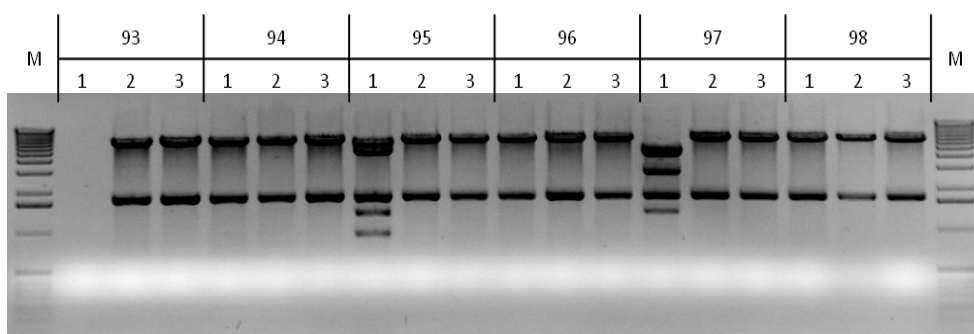


Figura 64 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 93, 94, 95, 96, 97 e 98. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

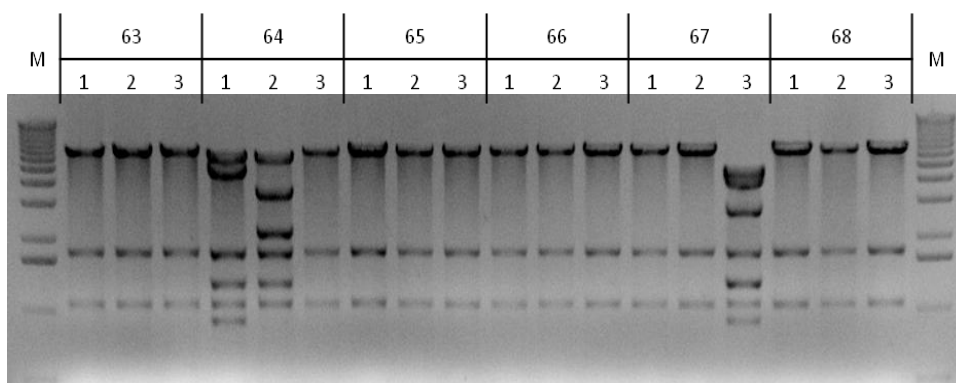


Figura 65 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 63, 64, 65, 66, 67 e 68. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

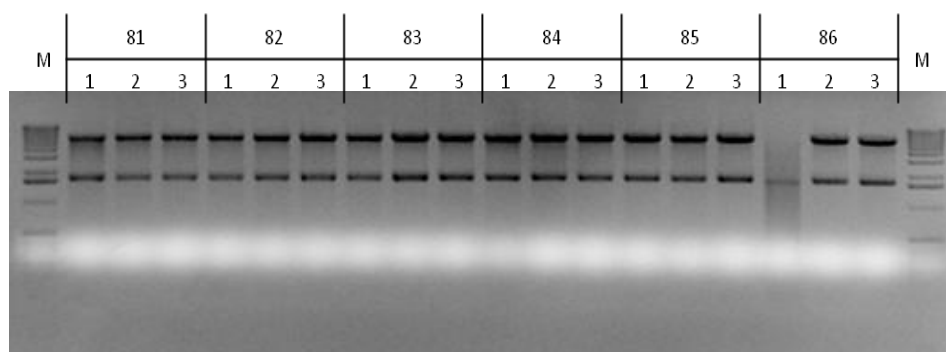


Figura 66 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 81, 82, 83, 84, 85 e 86. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

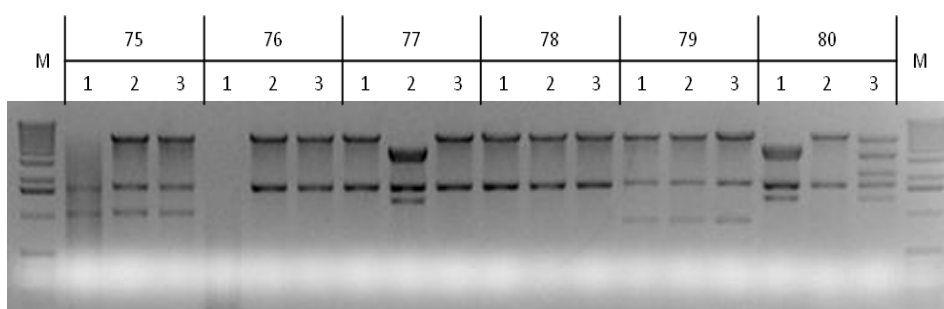


Figura 67 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 75, 76, 77, 78, 79 e 80. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

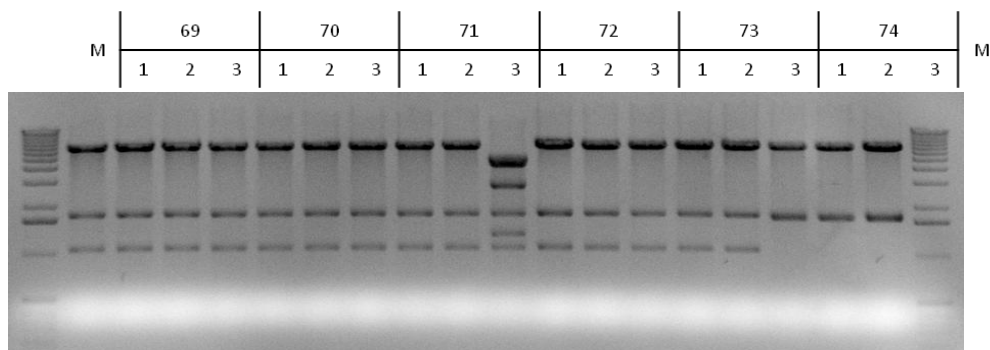


Figura 68 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 69, 70, 71, 72, 73 e 74. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

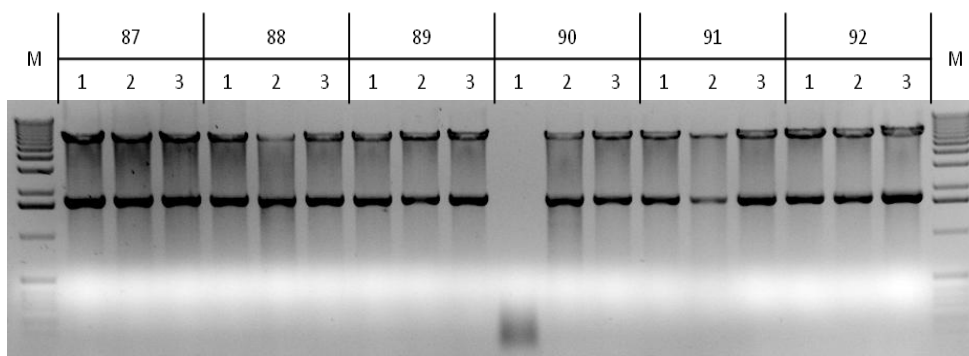


Figura 69 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria dos clones 87,88, 89, 90, 91 e 92. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

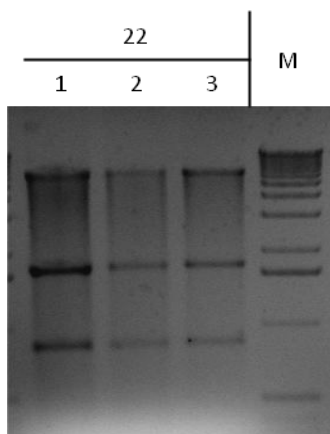


Figura 70 – Electorforese em gel de agarose com a digestão enzimática de colónias de bactéria do clone 22. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder

